

Aus dem Institut für Ernährungswissenschaft I
der Justus Liebig-Universität Gießen
Direktor: Professor Dr. H.-D. Cremer

**Einfluß der alimentären Mangan-Versorgung
auf die Aktivität der Arginase, Tryptophan-
Pyrrolase, Glutaminsynthetase und
 γ -Glutamyl-Transferase in der Leber der Ratte**

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
bei dem Fachbereich Ernährungswissenschaften
der Justus Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von
Sabine Walsch, geb. Folgmann
aus Nordenham

Gießen 1971

1972
—

Aus dem Institut für Ernährungswissenschaft I
der Justus Liebig-Universität Gießen
Direktor: Professor Dr. H.-D. Cremer

**Einfluß der alimentären Mangan-Versorgung
auf die Aktivität der Arginase, Tryptophan-
Pyrrolase, Glutaminsynthetase und
 γ -Glutamyl-Transferase in der Leber der Ratte**

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
bei dem Fachbereich Ernährungswissenschaften
der Justus Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von
Sabine Walsch, geb. Folgmann
aus Nordenham

Gießen 1971



Dekan:

Prof. Dr. H. Linser

1. Berichterstatter:

Prof. Dr. G. Rehner

2. Berichterstatter:

Prof. Dr. H. Brune

Tag der mündlichen Prüfung:

4.1.1972

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
Allgemeine Problemstellung	1
<u>Teil A: Arginase (EC 3.5.3.1.)</u>	3
A 1. Literaturübersicht	3
A 2. Eigene Versuche	6
A 2.1. Problemstellung	6
A 2.2. Versuchsanordnung, Material und Methoden	6
A 2.2.1. Versuchstiere und Tierhaltung	6
A 2.2.2. Versuchsanordnung	7
A 2.2.3. Versuchskost	9
A 2.2.4. Enzympräparat für die kinetischen Untersuchungen	12
A 2.2.5. Analytische Untersuchungsmethoden	14
A 2.2.5.1. Vorbereitung des Materials	14
A 2.2.5.2. Bestimmung der Arginase-aktivität	14
A 2.2.5.3. Bestimmung der Proteinkonzentration in der Leber	16
A 2.2.5.4. Bestimmung des Harnstoffgehaltes im Urin	17
A 2.2.5.5. Bestimmung der Mangankonzentration im Versuchsfutter und im Leberhomogenat	20
A 2.3. Versuchsergebnisse	21
A 2.3.1. Gewicht und Proteinkonzentration der Leber	21

A 2.3.2.	Retention von Mangan in der Leber	22
A 2.3.3.	Aktivität der Leberarginase	23
A 2.3.3.1.	Einfluß der Manganzufuhr auf die Arginaseaktivität	23
A 2.3.3.2.	Einfluß der Proteinzufuhr auf die Arginaseaktivität	24
A 2.3.4.	Einfluß der Protein- und Manganzufuhr auf die Harnstoffausscheidung	26
A 2.3.5.	Einfluß der Mangankonzentration auf die Aktivität der Arginase in vitro	27
A 2.4.	Diskussion der Ergebnisse	29
<u>Teil B:</u>	<u>Tryptophan-Pyrrolase (EC 1.11.1.4.)</u>	33
B 1.	Literaturübersicht	33
B 2.	Eigene Versuche	36
B 2.1.	Problemstellung	36
B 2.2.	Versuchsanordnung, Material und Methoden	36
B 2.2.1.	Versuchstiere, Tierhaltung und Versuchskost	36
B 2.2.2.	Versuchsanordnung	36
B 2.2.3.	Analytische Untersuchungsmethoden	37
B 2.2.3.1.	Vorbereitung des Materials	37
B 2.2.3.2.	Bestimmung der Tryptophan-Pyrrolase-Aktivität	37
B 2.2.3.3.	Bestimmung der Proteinkonzentration in der Leber und im zu den Ansätzen verwendeten Überstand	39

	Seite
B 2.2.3.4. Bestimmung der Konzentration der Gesamtlipide in der Leber	40
B 2.2.3.5. Bestimmung der Mangankonzentration im Versuchsfutter und im Lebergewebe	41
B 2.3. Versuchsergebnisse	41
B 2.3.1. Retention von Mangan in der Leber	41
B 2.3.2. Aktivität der Tryptophan-Pyrrolase in der Leber bei unterschiedlicher alimentärer Mangan-Zufuhr	42
B 2.3.3. Aktivität der Tryptophan-Pyrrolase als Funktion der Mn^{2+} -Konzentration in vitro	43
B 2.4. Diskussion der Ergebnisse	45

<u>Teil C: Glutaminsynthetase (EC 6.3.1.2.) und</u> <u>γ-Glutamyl-Transferase (EC 6.3.1.2. ?)</u>	47
C 1. Literaturübersicht	47
C 2. Eigene Versuche	50
C 2.1. Problemstellung	50
C 2.2. Versuchsanordnung, Material und Methoden	51
C 2.2.1. Versuchstiere, Tierhaltung, Versuchskost und Versuchsanordnung	51
C 2.2.2. Analytische Untersuchungsmethoden	51
C 2.2.2.1. Vorbereitung des Materials	51
C 2.2.2.2. Bestimmung der Glutaminsynthetase- und der γ -Glutamyl-Transferase-Aktivität	52

C 2.2.2.3.	Bestimmung der Proteinkonzentration in der Leber	55
C 2.2.2.4.	Bestimmung der Mangankonzentration in der Leber und im Leber-Aceton- trockenpulver	55
C 2.3.	V Versuchsergebnisse	56
C 2.3.1.	Retention von Mangan in der Leber	56
C 2.3.2.	Aktivität der Glutaminsynthetase und der γ -Glutamyl-Transferase in der Leber bei unterschiedlicher alimen- tärer Mangan-Zufuhr	56
C 2.3.3.	Aktivität der Glutaminsynthetase und der γ -Glutamyl-Transferase als Funktion der Mn^{2+} -Konzentration in vitro	58
C 2.4.	Diskussion der Ergebnisse	62
Allgemeine Diskussion		63
Zusammenfassung		64
Literaturverzeichnis		67

Allgemeine Problemstellung

Nach der in der Ernährungsphysiologie allgemein geltenden Auffassung gehört Mangan zu jenen Nährstoffen, die auch für die höheren Säugetierarten, einschließlich den Menschen, lebensnotwendig sind. Der Begriff der Lebensnotwendigkeit beinhaltet das Postulat, daß dem betreffenden Nährstoff im intakten Organismus eine spezifische, d.h. durch andere Nährstoffe nicht gleichwertig erfüllbare, biochemische Rolle zukommt und somit bei fehlender bzw. ungenügender Zufuhr mit der Nahrung der Ablauf bestimmter biochemischer Prozesse gestört ist.

Tatsächlich wurden von einer Reihe von Autoren (5) (61) bei experimentell erzeugtem alimentärem Manganmangel verschiedener Säugetierspezies eine Reihe von Symptomen beschrieben, welche durch Manganzufuhr rückgängig gemacht werden konnten. Uncharakteristische Erscheinungen wie Wachstumsverzögerung, funktionelle Degeneration der Fortpflanzungsorgane, herabgesetzte Lactationsfähigkeit, verminderte Lebensfähigkeit der Nachkommen werden hauptsächlich von älteren Autoren erwähnt, die jedoch fast ohne Ausnahme auch das Auftreten von Ataxie und Skelettveränderungen bei Nachkommen von Säugetiermüttern mit experimentell erzeugtem Manganmangel registrieren. Auf diese beiden Erscheinungen konzentrierten sich in der Hauptsache die Forschungen der letzten Jahre. Sie haben einen Kausalzusammenhang zwischen dem Auftreten der Ataxie und den Störungen, welche die vitalen Prozesse des Knochenstoffwechsels - insbesondere die Knorpelbildung - betreffen, aufgedeckt. Vereinzelte Befunde deuten darauf hin, daß Mangan auch bei weiteren physiologischen Vorgängen, beispielsweise bei der Aufrechterhaltung des Blutglukosespiegels und der Regulation des Fettansatzes, eine gewisse Rolle spielen könnte.

Der Vielfalt der in vivo-Symptome, welche beim experimentell erzeugten Manganmangel beim Säugetier beschrieben worden sind, steht eine fast unübersehbare Anzahl von in vitro festgestellten Wirkungen des Mangans gegenüber, bei denen das zweiwertige Mangan-Ion als Effektor enzymatischer Prozesse eine mehr oder minder spezifische Rolle spielt.

Die oxidative Phosphorylierung, der Stoffwechsel des Cholesterins, der Lipide, der Fettsäuren, der Nucleotide, der Kohlenhydrate, der Peptide und der Aminosäuren sind metabolische Vorgänge, an denen Enzyme oder Enzymsysteme beteiligt sind, deren Reaktionskinetik in vitro durch Mangan-Ionen beeinflusbar ist.

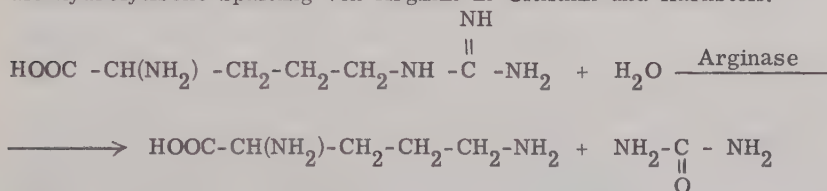
Trotz der Vielzahl der Untersuchungen, die einerseits in vivo andererseits in vitro durchgeführt worden sind, ist es bis jetzt nicht gelungen, den biochemischen Wirkungsmechanismus des Mangans im intakten Organismus - der zweifelsohne bei der enzymatischen Katalyse zu suchen ist - zu klären. Es konnte bisher unseres Wissens keiner der in vitro-Effekte des Mangans mit Sicherheit den Symptomen, die bei Manganmangel im Säugetierorganismus auftreten, zugeordnet werden.

Zielsetzung vorliegender Untersuchungen war es, einen Beitrag zur Klärung der Frage zu leisten, wieweit Effektor-Wirkungen des Mangans, die in vitro festgestellt worden sind, als solche auch bei den Enzymen des intakten Organismus unter den in vivo gegebenen Bedingungen möglich sind. Weiterhin gehörte zu den Aufgaben der Versuche, die biologische Relevanz der auch in vivo feststellbaren Effektor-Wirkungen des Mangans für den intakten Organismus zu prüfen. Als Gegenstand der Untersuchungen wurden die Systeme Arginase - Mangan, Tryptophan-Pyrrolase - Mangan, Glutaminsynthetase - Mangan und γ -Glutamyl-Transferase - Mangan ausgewählt.

Teil A: Arginase (EC 3.5.3.1.)

A 1. Literaturübersicht

Die Arginase (L - Arginin - ureohydrolase) gehört zu den Enzymen, die an der Harnstoffsynthese im Krebs-Henseleit-Zyklus, dem Hauptweg der N-Ausscheidung beim Säugetier, beteiligt sind (30). Sie katalysiert die hydrolytische Spaltung von Arginin in Ornithin und Harnstoff:



Dieser Funktion entsprechend findet sich in der Leber von Säugetieren die höchste Arginasekonzentration.

Wie aufgrund kinetischer Untersuchungen in vitro hinlänglich bekannt ist, wird die Aktivität der Enzyme neben den physiko-chemischen Bedingungen des Reaktionsmilieus in starkem Maße von der Substratkonzentration sowie in den meisten Fällen von der Anwesenheit und Konzentration bestimmter Effektoren beeinflusst. Dies ist auch bei der Arginase der Fall. Sie wird durch zweiwertige Kationen aktiviert, in erster Linie durch Mangan (48). Mn^{2+} -Ionen aktivieren in vitro am stärksten bei einem pH-Wert von annähernd 10, der auch dem Wirkungsoptimum des Enzyms entspricht (17) (49).

Hinweise darauf, daß der aktivierende Effekt des Mangans auch in vivo feststellbar ist, brachten orientierende Untersuchungen von Boyer u. a. - im Jahre 1942 (2), und von Shils u. a. - im Jahre 1943 (55). Beide Autorengruppen verglichen Ratten, die mit einer manganarmen Kost gefüttert wurden mit vollversorgten Tieren. In beiden Fällen gelang es, bei alimentärem Manganmangel eine Abnahme der katalytischen Aktivität der Leberarginase nachzuweisen. Systematische Untersuchungen über diesen in vivo - Effekt des Mangans sind in den letzten Jahren von

Rehner und Cremer durchgeführt worden (47). In einer ersten Versuchsreihe wurde die Annahme bestätigt, daß sich die Aktivität der Leberarginase bei verschieden hoher alimentärer Manganzufuhr dem Versorgungszustand proportional ändert. Tiere mit 2 ppm Mangan im Futter zeigten die geringste Enzymaktivität, höher lagen die Werte bei den Tieren mit 25 ppm, und am höchsten bei denen mit 50 ppm Mangan im Futter. In einer zweiten Versuchsreihe wurde das Verhalten der Arginaseaktivität in Abhängigkeit von der Dauer des alimentären Manganmangels geprüft. Die Versuche ergaben, daß bereits innerhalb von 14 Tagen nach Beginn der Mangelperiode die Aktivität des Enzyms - parallel zum Mangangehalt der Leber - steil abfällt. Innerhalb von 14 Wochen war eine Aktivitätsdepression von etwa 23 % zu verzeichnen. Von da an verlangsamte sich der Aktivitätsrückgang und betrug am Ende der einjährigen Versuchsperiode ca. 30 %.

In beiden Versuchsreihen wurde also festgestellt, daß die Aktivität der Leberarginase eindeutig mit der Höhe der alimentären Manganzufuhr korreliert ist. Der Mechanismus der Aktivierung durch die Mn^{2+} -Ionen ist bisher noch nicht geklärt. Es steht ebenfalls noch offen, ob die Unterschiede in der Enzymaktivität auf einem Unterschied in dem Gehalt an Apoenzym beruhen. Wenn dies der Fall wäre, so wäre am ehesten anzunehmen, daß bei einem Manganmangel die Abbaurate des Enzymproteins erhöht ist. Dies wäre eine in vivo Bestätigung des stabilisierenden Effektes von Mn^{2+} -Ionen, wie er aus Versuchen in vitro lange bekannt ist.

Ebenso wie der Mangangehalt einer Kost, wirkt sich auch der Proteingehalt auf die Arginaseaktivität aus, und zwar in größenordnungsmäßig vergleichbarer Stärke. Zahlreiche Autoren, wie Lightbody u. a. (1939) (35), Seifter u. a. (1948) (51), Mandelstam u. a. (1952) (38), Ashida u. a. (1961) (1) und Schimke (1961) (52) haben übereinstimmend festgestellt, daß die Arginaseaktivität proportional zur Proteinzufuhr ansteigt bzw. abfällt. Schimke fand z. B. bei der Verabreichung von Futter mit einem Proteingehalt von 30 bzw. 60 % an Ratten innerhalb von 14 Tagen eine

Zunahme der Leberarginaseaktivität um 27 bzw. 70 % im Vergleich zur Aktivität jener Tiere, deren Kost 15 % Protein enthielt. Durch Reindarstellung des Enzyms konnte er zeigen, daß es sich bei den Änderungen der Enzymaktivität um Änderungen im Gehalt an Enzymprotein handelt.

Anhaltspunkte dafür, daß sich die durch verschieden hohe Proteingaben hervorgerufenen Änderungen in der Arginaseaktivität auf die Harnstoffausscheidung auswirken - und damit physiologische Relevanz erlangen - finden sich in den Arbeiten von Muramatsu u.a. (42), Ashida u.a. (1) und Schimke (52). Ashida u.a. stellten während einer Zeitdauer von 10 Tagen eine gleichsinnige Erhöhung der Arginaseaktivität und der Harnstoffausscheidung fest, wenn die Versuchstiere von einer 25 % Kasein enthaltenden Diät auf eine mit 70 % Kasein gesetzt wurden. Schimke untersuchte die Arginaseaktivität und die Harnstoffausscheidung bei Ratten, die eine Kostform mit 15 %, 30 % und 60 % Protein erhielten, und stellte ebenfalls eine enge Korrelation zwischen dem Enzymgehalt der Leber und der täglichen Harnstoffausscheidung fest. Diese Korrelation zwischen Proteinzufuhr, Arginaseaktivität und Harnstoffausscheidung wird von allen Autoren als Enzymadaptation, d.h. als Anpassung der Arginaseaktivität an die Intensität des Proteinabbaues bzw. der Harnstoffsynthese angesehen.

A 2. Eigene Versuche

A 2.1. Problemstellung

Die durch Variieren der Manganzufuhr einerseits und durch unterschiedlich hohe Proteinzufuhr andererseits erzielten Effekte, die hinsichtlich ihrer Intensität durchaus vergleichbar sind, ließen es interessant erscheinen, die Aktivität der Arginase, sowie die Intensität der Biosynthese von Harnstoff bei kombiniertem Einwirken beider Faktoren zu untersuchen.

Zielsetzung der nachfolgend beschriebenen Versuche war es festzustellen:

1. Ob und bei welcher quantitativen Relation der beiden Faktoren die durch Manganmangel bedingte Depression der Arginaseaktivität durch die aktivitätssteigernde Wirkung eines hohen Proteinangebotes ausgeglichen werden kann.
2. Ob die durch einen Manganmangel hervorgerufene Aktivitätsdepression der Arginase sich auf die Harnstoffbildung auswirkt und damit für den Gesamtorganismus eine physiologische Bedeutung erlangt.
3. Wie sich die Aktivität der Arginase als Funktion der Mangankonzentration in vitro verhält und wie weit dieses Verhalten zur Erklärung der Effekte in vivo, bei alimentärer Zufuhr von Mangan, geeignet ist.

A 2.2. Versuchsanordnung, Material und Methoden

A 2.2.1. Versuchstiere und Tierhaltung

Als Versuchstiere dienten 60 weibliche Wistar - Ratten⁺, die bei Versuchsbeginn ca. 40 - 50 g schwer waren. Sie wurden je zu zweien in Plastik Käfigen⁺⁺ mit Glasstabböden gehalten. Zur Vermeidung eventueller

⁺ Züchter: Mayer - Arendt, Bad Salzungen

⁺⁺ Trovidur

Kontamination mit Mangan wurden Gegenstände aus Metall bei der Herstellung der Kost und in der unmittelbaren Umgebung der Tiere nach Möglichkeit vermieden.

A 2.2.2. Versuchsanordnung

In einer kurzen Eingewöhnungszeit erhielten die Tiere zuerst fünf Tage lang Haferflocken, anschließend 7 Tage hindurch eine Mischung aus Haferflocken und Versuchskost (s.u.). Wie die schon vorhin erwähnten Untersuchungen von Rehner und Cremer (4) zeigten, ist eine ziemlich lange Zeitspanne (mindestens 14 Wochen) nötig, bis sich die Arginaseaktivität an eine Änderung der alimentären Manganzufuhr angepaßt hat. Deshalb mußte vor den eigentlichen Hauptversuch eine sogen. "Vorversuchsperiode" eingeschaltet werden: die Tiere wurden unter Berücksichtigung ihres Körpergewichtes in zwei Gruppen zu je 30 Tieren eingeteilt und bildeten so eine

Manganmangel - Gruppe und eine mit
Mangan vollversorgte Gruppe.

Beide Gruppen erhielten ad libitum eine halbsynthetische Kost mit 20 % Kasein (s.u.) entweder ohne oder mit Mangan-Zusatz. Das Futter der Manganmangel - Gruppe enthielt durchschnittlich 0,4 mg Mn je kg, das Futter der Mangan - vollversorgten Gruppe 50 mg Mn je kg Futter - dies ist die zur Bedarfsdeckung der Ratte empfohlene Mangandosis (43).

In den vorliegenden Untersuchungen erstreckte sich die Vorversuchsperiode über 24 Wochen. Während dieser Zeit konnten in der Mangel-Gruppe keine klinischen Symptome eines Manganmangels bemerkt werden. Auch die Gewichtsentwicklung verlief normal. Am Ende der Vorversuchsperiode hatten die Manganmangel-Tiere ein geringfügig niedrigeres Durchschnittsgewicht als die vollversorgten Tiere - 276 g gegenüber 293 g. Diese Gewichts Differenz war aber nicht signifikant.

Anschließend folgte die eigentliche Hauptversuchsperiode. Hierfür wurde sowohl die Manganmangel-Gruppe als auch die vollversorgte Gruppe in

jeweils 3 weitere Gruppen zu je 10 Tieren unterteilt. Die Versuchsanordnung der Hauptversuchsperiode wird in Tabelle 1 schematisch dargestellt:

Tabelle 1: Versuchsanordnung der Hauptversuchsperiode

Manganmangel- -Gruppe (0,4 ppm Mn i. d. Kost)		I _O (10 % Casein) II _O (20 % Casein) III _O (60 % Casein)
Mangan-vollversorgte Gruppe (50 ppm Mn i. d. Kost)		I _{Mn} (10 % Casein) II _{Mn} (20 % Casein) III _{Mn} (60 % Casein)

Die Gruppe II_O bzw. II_{Mn} erhielt weiter das halbsynthetische Futter mit 20 % Kasein. Bei Gruppe I_O bzw. I_{Mn} wurde der Proteingehalt im Austausch gegen Saccharose auf 10 % herabgesetzt und bei Gruppe III_O bzw. III_{Mn} auf 60 % heraufgesetzt.

Nach Angaben von Mandelstam u. a. (38), Ashida u. a. (1) und Schimke (52) dauert es etwa 8 Tage bis 3 Wochen, bis sich die Arginaseaktivität auf Änderungen in der Proteinzufuhr eingestellt hat. Im vorliegenden Fall wurde für die Hauptversuchsperiode eine Zeitspanne von 13 Tagen gewählt. Während dieser Zeit wurden die Tiere in Einzelkäfigen untergebracht und einem "paired feeding" unterworfen. Alle Ratten bekamen - bezogen auf ihr Körpergewicht - die gleiche Futtermenge, die täglich neu eingewogen wurde⁺. Auf diese Weise war die aufgenommene Proteinmenge je 100 g Körpergewicht bei den Tieren innerhalb einer Gruppe gleich, und die Proteinzufuhr der Gruppen untereinander verhielt sich wie 1 : 2 : 6.

Infolge der Umstellung auf das neue Futter (von 20 % auf 10 % bzw. 60 % Kasein) ging die Freßlust der Tiere zurück, so daß die täglich

⁺ Die Einwaage richtete sich nach der Futtermenge, welche die Gruppe mit dem geringsten Verzehr am vorausgegangenen Tag aufgenommen hatte.

angebotene Futtermenge klein gehalten werden mußte, um einen völligen Verzehr zu gewährleisten. Die Ratten erhielten 2,45 g Futter je 100 g Körpergewicht und Tag. Diese Futtermenge enthält - auch bei 10 % Kasein - noch so viel Protein, wie zur Bedarfsdeckung ausgewachsener Tiere nötig ist (43). Die durchschnittliche Gewichtsabnahme der Ratten während der paired-feeding-Periode betrug 28 g. Dieser Betrag ist noch so klein, daß er auf Abbau von Körperfett zurückgeführt werden kann, und daß ein Abbau von Körperprotein kaum erwartet werden kann.

Während der letzten 3 Tage der Hauptversuchsperiode kamen die Tiere einzeln in Stoffwechselkäfige, um die Harnstoffausscheidung zu bestimmen. Der Urin wurde jeweils täglich entnommen und tiefgefroren, um die bakterielle Zersetzung des Harnstoffs möglichst niedrig zu halten. Als Konservierungsmittel wurde in das Auffanggefäß 0,1 ml verdünnte Schwefelsäure (5 %ig) gegeben. Die drei Tagesportionen wurden zusammengefaßt und bis zur Durchführung der Analyse des Harnstoffgehaltes in Plastikflaschen bei - 18° C aufbewahrt.

Am Ende des Versuches wurden die Tiere durch Decapitation getötet. Nach dem Ausbluten wurde die Leber entfernt und die Arginaseaktivität sofort bestimmt.

A 2.2.3. Versuchskost

Die Suche nach einer Kostform, die geeignet war, einen hochgradigen Manganmangel zu erzeugen, und die außerdem den Anforderungen an den Proteingehalt gerecht wurde, nahm vor Beginn der Versuche einige Zeit in Anspruch. Die meisten Autoren, denen es gelungen war, Mangan-Mangelerscheinungen bei der Ratte hervorzurufen, verfütterten Frischmilch (2), eine Kostform, deren Verfütterung sehr arbeitsaufwendig ist, und die außerdem infolge ihres großen Volumens wenig geeignet erscheint, da sie die Zufuhr aller Nährstoffe in ausreichender bzw. variabler Menge nicht garantiert.

Rehner und Stelte (48) verwendeten für ihre Untersuchungen eine Kostform mit Trockenmagermilch als Proteinquelle. Trockenmagermilch ist sehr arm an Mangan und enthält von allen essentiellen Mineralstoffen mit Ausnahme von Eisen, Kupfer und Jod so viel, daß der Bedarf der Ratte an diesen Nährstoffen mit ca. 50 % Magermilchpulver in der Kost voll gedeckt werden kann.

Der Vorteil der Kostformen auf Milchbasis liegt darin, daß sich der in den Kostformen auf Kaseinbasis übliche Zusatz von Mineralstoffen (4 %) erübrigt. Die Mineralstoffmischung bildet nämlich die Hauptquelle der unerwünschten Kontamination der Kost mit Mangan, da ihre einzelnen Komponenten mit mehr oder minder großen Mangan-Spuren verunreinigt sind (46). Die Anwendung spektralreiner Salze für Futtermischungen wäre zu kostspielig.

Für den vorliegenden Versuch waren Kostformen auf Milchbasis nicht anwendbar, da ihr Proteingehalt sich nicht variieren läßt. Es wurde deshalb ein Futter mit Kasein als Proteinquelle gewählt. Die Kost hatte folgende Zusammensetzung:

<u>Futter</u>	<u>I</u>	<u>II</u>	<u>III</u>
Saccharose	70,0 % bzw.	60,0 % bzw.	20,0 %
Reisstärke DAB 6	6,6 %		
Kasein (alkalilöslich)	10,0 % bzw.	20,0 % bzw.	60,0 %
Schweineschmalz (mit			
Vitamin A,D,E) ⁺	7,0 %		
Mineralstoffmischung ⁺⁺⁺	4,0 %		
Methionin	0,2 %		
Cholinchlorid	0,2 %		
Vitamin ⁺⁺ -Reisstärke-			
-Mischung	2,0 %		

+) Fettlösliche Vitamine je 100 g Futter : Vitamin A 1000 I.E., Vitamin D 130 I.E., Vitamin E 10 mg.

Die fettlöslichen Vitamine wurden in das angeschmolzene Schweineschmalz eingerührt.

++) Wasserlösliche Vitamine je 100 g Futter : Thiamin 0,5 mg, Riboflavin 2,0 mg, Pyridoxin 0,5 mg, Pantothersäure 5,0 mg, Inosit 40,0 mg, Cobalamin 2 µg, Nicotinsäureamid 10,0 mg, p-Aminobenzoessäure 10,0 mg, Biotin 30 µg, Folsäure 0,5 mg, Menadion 1,0 mg, Ascorbinsäure 18,0 mg.

Die wasserlöslichen Vitamine wurden sehr sorgfältig untereinander vermischelt und dann in Reisstärke eingearbeitet.

Methionin und Cholinchlorid wurden ebenfalls manuell in Reisstärke eingerührt.

+++ Mineralstoffe je 100 g Futter : Na 262 mg, K 290 mg, Ca 217 mg, P 270 mg, Mg 40 mg, Cl 405 mg, S 53 mg, Fe 6,8 mg, J 2,4 mg, Mo 0,1 mg, Co 49 µg.

Folgende Verbindungen wurden verwendet (mg / 100 g Futter):

K_2HPO_4	1288,00
Ca-Lactat	1300,00
Na Cl	668,00
$Ca (H_2PO_4)_2 \cdot H_2O$	300,00
$MgSO_4 \cdot 7 H_2O$	408,00
$FePO_4 \cdot 4 H_2O$	27,00
KJ	3,20
$(NH_4)_6Mo_7O_{24} \cdot 4 H_2O$	1,84
$CoCl_2 \cdot 6 H_2O$	0,20

Die Mineralstoffmischung wurde durch Mörsern hergestellt.

Für die Mineralstoffmischung wurden stets nur Reagentien des Reinheitsgrades p.a. bzw. DAB verwendet, um die Verunreinigung des Futters mit Mangan-Spuren möglichst einzuschränken. Durch sorgfältige Auswahl von Salzen, die bei der Analyse einen geringen Mangangehalt zeigten, konnte der Mangangehalt des Futters erheblich gesenkt werden.

Zn und Cu wurden im Trinkwasser verabreicht als $ZnCl_2$ und $CuSO_4 \cdot 5 H_2O$, entsprechend 0,6 mg Zn / 100 ml und 0,5 mg Cu / 100 ml aqua dest..

Dem Futter der Mangan-vollversorgten Tiergruppe wurde zusätzlich noch $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ - entsprechend 50 mg Mangan pro kg Futter - beigemischt. Das Futter wurde in 5 kg Chargen in einer Futtermischmaschine⁺ 30 Minuten lang gemischt.

Der Mangangehalt der Kost wurde jeweils bei Herstellung neuer Chargen kontrolliert. Es ergab sich ein durchschnittlicher Mangangehalt des Futters von

0,4 mg Mn / kg Futter (20 % Kasein)

0,4 mg Mn / kg Futter (10 % Kasein)

0,6 mg Mn / kg Futter (60 % Kasein)

Damit lag der Mangangehalt niedriger als bei der Trockenmagermilch-Kostform (48), die durchschnittlich 1 ppm Mangan enthielt.

A 2.2.4. Enzympräparat für die kinetischen Untersuchungen

Die Kinetik der Aktivierung in vitro wurde an einem aus Rattenleber angereicherten Enzympräparat bestimmt. Zur Anreicherung der Arginase wurden die ersten vier Präparationsschritte eines Verfahrens zur Reindarstellung der Arginase aus Rattenleber angewendet (29).

Reagentien:

Natriummaleinatpuffer (pH 6,8) : 5,8 g Maleinsäure und 11,84 g KCl werden mit 500 ml aqua bidest gelöst und mit 1 N NaOH auf pH 6,8 eingestellt. Die Lösung wird mit aqua bidest auf 1 l aufgefüllt und der pH-Wert nochmals überprüft.

Tris-Glycin-HCl-Puffer (0,05 M, pH 8) : 3,75 g Glycin werden in 100 ml 1 M Tris-Lösung und 700 ml aqua bid. gelöst, mit 1 N HCl auf pH 8,0 eingestellt und mit Wasser auf 1 l aufgefüllt.

Methanol p. a.

Durchführung der Enzympräparation: 100 g frische Rattenleber wurden in 400 ml eiskaltem Natriummaleinatpuffer homogenisiert und danach

⁺) Lödige-Mischer, Modell M 20 - E

30 Minuten lang bei 4⁰ C mit 27300 x g zentrifugiert. Der Niederschlag wurde verworfen.

Hitze-fällung: Der Überstand wurde in einem Wasserbad von 90⁰ C unter kräftigem Rühren möglichst schnell auf 60⁰ C erhitzt, 10 Min. lang in ein Wasserbad von 60⁰ C gestellt und nach Abkühlen im Eisbad 50 Minuten bei 4⁰ C mit 27300 x g zentrifugiert. Der Niederschlag wurde verworfen.

Fraktionierte Methanolfällung: Der Überstand wurde bei 4⁰ C langsam mit dem gleichen Volumen -10⁰ C kaltem Methanol versetzt, 10 Minuten stehengelassen und 10 Min. bei 4⁰ C mit 2000 x g zentrifugiert. Der Niederschlag wurde verworfen und der Überstand nochmals langsam mit dem gleichen Volumen kaltem Methanol versetzt. Der hierbei entstehende Niederschlag wurde nach 10 Min. Stehenlassen 10 Min. bei 4⁰ C mit 20.000 x g abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, der Niederschlag in etwa 15 ml Tris-Glycin-Puffer suspendiert. Nach etwa 30 Min. wurden die unlöslichen Anteile 10 Min. bei 4⁰ C mit 20 000 x g abzentrifugiert. Der klare, braunrote Überstand wurde 12 Stunden gegen 1 l Tris-Glycin-HCl-Puffer dialysiert. Anschließend wurde er so verdünnt, daß sich eine Proteinkonzentration von etwa 15 mg / ml ergab und für die Ansätze verwendet. Herstellung der Ansätze siehe A 2.2.5.2. Die auf Protein bezogene Aktivität des Präparates war etwa sechsmal höher als die Aktivität des Ausgangshomogenates. Das Präparat war annähernd frei von Mangan; die Konzentration an Mn²⁺ lag um etwa zwei Zehnerpotenzen niedriger als die Konzentration der Ansätze im "physiologischen" Bereich (für Definition s. A 2.3.5.).

A 2.2.5. Analytische Untersuchungsmethoden

A 2.2.5.1. Vorbereitung des Materials

Die Leber der decapitierten und entbluteten Tiere wurde entnommen und für ca. 1/2 Stunde zum Auskühlen in den Kühlschrank ($+4^{\circ}\text{C}$) gelegt. Anschließend wurde das Lebergewicht festgestellt und die Leber mit einem Messer fein zerkleinert, wobei möglichst viel Bindegewebe aus dem Leberparenchym entfernt wurde. 6 g Lebergewebe und 20 ml aqua bidest wurden mit einem Potter-Elvehjem-Homogenisator 12 Minuten lang im Eisbad homogenisiert (Hom. I). 2 ml Homogenat I wurden mit 8 ml aqua bidest verdünnt und nochmals 3 Minuten lang im Messerkreuzhomogenisator (50 000 U/Min.) zerkleinert. Das erhaltene Homogenat (Hom. II) wurde sofort zur Bestimmung der Arginaseaktivität verwendet. Ein Teil wurde tiefgefroren (-18°C) und diente später zur Bestimmung des Proteingehaltes in der Leber.

A 2.2.5.2. Bestimmung der Arginaseaktivität

Als Maß für die katalytische Wirkung des Enzyms diente die Argininmenge, die durch eine bestimmte Menge von Leberhomogenat unter konstanten Reaktionsbedingungen - pH 9,5, Temp. 30°C - während einer Reaktionszeit von 10 Minuten umgesetzt wurde. Das Leberhomogenat wurde entweder ohne Zugabe von Mangan oder mit Zusatz von $14\text{ }\mu\text{Mol}$ Mangan pro Gramm Lebergewebe bei 38°C eine Stunde lang vorinkubiert. - Diese Zeit nimmt die volle Aktivierung der Arginase durch Mn^{2+} -Ionen in Anspruch. - Anschließend wurde Arginin-Hydrochlorid als Substrat zugesetzt. Nach einer Reaktionszeit von 10 Minuten bei 30°C wurde die Reaktion mit HClO_4 gestoppt und die nicht umgesetzte Argininmenge nach einer von Rosenberg, Ennor und Morrison (50) beschriebenen Modifikation der Sakaguchi-Methode colorimetrisch bestimmt. Die Methode beruht auf der Farbreaktion, welche substituierte Guanidine mit Diacetyl und α -Naphthol in alkalischer Lösung geben.

Reagentien:

0,1 M Lösung von $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ in aqua bidest

Na_2CO_3 - NaHCO_3 - Puffer (0,1 molar, pH 9,5)

25 mM Lösung von L-Arginin-Hydrochlorid in aqua bidest.
(Die Lösung muß täglich frischangesetzt werden.)

HClO_4 (etwa 15 %ig)

Natronlauge (0,43 N)

"Entwickler-Reagenz": 20 ml einer 25 %igen α -Naphthol-Lösung (25 g α -Naphthol / 100 ml n-Propanol) werden mit 2,5 ml einer 1 %igen Diacetyl-Lösung (1 ml Diacetyl / 100 ml n-Propanol) gemischt. Anschließend wird mit n-Propanol auf 100 ml aufgefüllt. Das Reagenz wird nach Möglichkeit frisch verbraucht, da es sich mit der Zeit dunkler färbt und zu hohe Blindwerte ergibt.

Arginin-Standardlösung: 210,67 mg L-Arginin-Hydrochlorid wurden in 1 l aqua dest. gelöst. Diese 1 mM Standardlösung wurde unverändert - und im Verhältnis 1 : 100 verdünnt - zur Herstellung der Eichkurve (s. Abb. 5) verwendet. Die Lösung muß jeweils vor Gebrauch frisch angesetzt werden.

Durchführung der Bestimmung: 0,5 ml Homogenat II wurden in Zentrifugengläser pipettiert. Probe A und Probe C (jeweils 3 Parallelproben) erhielten einen Zusatz von 10 μl aqua bidest. Probe B (2 Parallelproben) erhielt einen Zusatz von 10 μl MnSO_4 -Lösung. Die Proben wurden gut durchmischt, im Wasserbad bei 38° C für 1 Stunde inkubiert und anschließend im Eisbad abgekühlt. Nun wurde in jede Probe 1 ml Puffer (eisgekühlt) gegeben und danach in die Proben A und B - möglichst rasch - jeweils 2 ml Argininlösung (eisgekühlt) einpipettiert. Nach kurzem Durchmischen wurden die Proben bei 30° C im Wasserbad inkubiert, und nach genau 10 Minuten der Arginin-Umsatz durch Zugabe von 2,5 ml HClO_4 je Probe gestoppt. Probe C diente zur Bestimmung der Argininmenge, welche sofort nach Zugabe des Substrates - d.h. vor Einwirkung der Leberarginase - im Ansatz vorhanden war. Diese Proben wurden vor Zugabe der Argininlösung mit HClO_4 versetzt.

Nach Absetzen des ausgefällten Niederschlages wurden alle Proben 20 Minuten lang bei 3000 U / Min. zentrifugiert, und der Überstand wurde in Reagenzgläser abgegossen. Jeweils 1 ml des Überstandes wurde in 25 ml-Kölbchen pipettiert, und die Kölbchen wurden mit aqua dest. bis zur Marke aufgefüllt. Die erhaltene Verdünnung wurde für die Arginin-Bestimmung verwendet:

Je 1 ml Probe (3 Parallelproben pro Kölbchen) wurde in Reagenzgläser einpipettiert, und nacheinander mit 7 ml NaOH und 2 ml Entwicklerreagenz versetzt. Da die Farbreaktion zeitabhängig ist, erfolgte die Zugabe des Entwicklers jeweils im Zeitabstand von 1 Minute von Probe zu Probe. Der Inhalt des Reagenzglases wurde mit kräftigem, gleichmäßigem Schütteln gemischt. Genau 20 Minuten nach Zugabe des Entwicklers zur ersten Probe wurde mit der Messung der Farbintensität begonnen - und zwar wiederum im Abstand von 1 Minute. Die Blindprobe, die in der gleichen Weise behandelt wurde, bestand aus 1 ml H₂O, 7 ml NaOH und 2 ml Entwicklerreagenz.

Die Bestimmung der Farbintensität wurde im Eppendorf-Photometer bei einer Schichtdicke von 10 mm und einer Wellenlänge von 546 nm (Hg Filter) vorgenommen.

Zur Ermittlung der umgesetzten Argininmenge wurde der in Probe A bzw. B bestimmte Arginingehalt (Rest-Arginin) vom Arginingehalt der Probe C subtrahiert.

Der Argininiumsatz wurde als mMol / 100 g Leber, μ Mol / 100 mg Leberprotein und m Mol / 100 g Körpergewicht berechnet.

A 2.2.5.3. Bestimmung der Proteinkonzentration in der Leber

Der Proteingehalt in der Rattenleber wurde im wesentlichen nach der von Lowry u. a. (37) angegebenen Methode mit dem Phenol-Reagenz von Folin ermittelt. Das Reagenz bildet mit dem im Eiweiß enthaltenen Tyrosin und Tryptophan eine blauviolette Färbung, die colorimetrisch meßbar ist.

Reagentien:

- Lösung A : 20 g Na_2CO_3 in 1 l 0,1 N Natronlauge
" B₁: 2,68 g Kaliumnatriumtartrat in 100 ml aqua dest.
" B₂: 1 g $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$ in 100 ml aqua dest.
" C : 1 ml Lösung B₁ + 1 ml Lösung B₂ + 100 ml Lösung A wurden unmittelbar vor Gebrauch gemischt.
" E : Phenolreagenz nach Folin und Ciocalteu⁺), mit H_2O 1 : 1 verdünnt.

Proteinstandard: Zur Herstellung der Eichkurve (s. Abb. 6) wurde ein flüssiges Kontrollserum⁺⁺ verwendet, das ca. 7 g Eiweiß je 100 ml enthält (genaue Angaben auf der jeweiligen Packung). Diese Standardlösung wurde kurz vor Gebrauch im Verhältnis 1 : 100 bzw. 1 : 200 mit aqua dest. verdünnt.

Durchführung der Bestimmung: 1 ml des aufgetauten Leberhomogenates (Hom. II) wurde 1 : 100 mit aqua dest. verdünnt. Je 0,5 ml dieser Verdünnung wurde in Reagenzgläser pipettiert (5 Parallelproben) und anschließend mit 5 ml Reagenz C unter kräftigem Schütteln vermischt. Die Proben wurden für 15 Minuten bei Zimmertemperatur im Dunklen aufbewahrt. Danach wurde je Probe 0,5 ml Reagenz E zugegeben, wobei sofort unter gleichmäßigem Schütteln gemischt wurde. Nach nochmaliger Aufbewahrung im Dunkeln (mindestens 70 Minuten!) wurde die Farbintensität der Proben bei einer Schichtdicke von 10 mm und einer Wellenlänge von 750 m μ im Zeiß-Spektralphotometer gemessen.

A 2.2.5.4. Bestimmung des Harnstoffgehaltes im Urin

Zur Bestimmung des Harnstoffes diente eine von Fawcett und Scott (11) beschriebene Methode. Sie beruht auf folgendem Prinzip: der Harnstoff wird in einer durch Urease katalysierten enzymatischen Reaktion unter Bildung von Ammoniumcarbonat gespalten. Die hierbei entstehenden

+) Folin-Ciocalteus Phenolreagenz, Merck

++) LAB-TROL; Dade, American Hospital Supply Corporation,
Miami U.S.A.

Ammoniumionen reagieren mit Phenol und Hypochlorit unter Bildung eines blauen Indophenol-Farbstoffes (Berthelot-Reaktion), dessen Farbin-
tensität der Harnstoffkonzentration proportional ist und photometrisch
gemessen wird. Nitroprussidnatrium als Katalysator beschleunigt den
Reaktionsablauf.

Reagentien:

Urease-Suspension⁺⁺ (1 mg Urease / ml), bei ca. + 4° C ein Jahr
haltbar.

Lösung 1: 50,7 mg Na-Nitroprussid in 1 l 0,106 molarer wässriger
Phenol-Lösung.

Lösung 2: 0,011 molare Lösung von Na-Hypochlorit in 0,125 molarer
Natronlauge. ⁺

Die Lösungen 1 und 2 wurden in einer dunklen Flasche aufbewahrt und
waren bei + 4° C ca. 4 Monate haltbar.

Harnstoff-Standardlösung: 30 mg Harnstoff wurden in 100 ml H₂O bidest.
gelöst. Die Lösung wurde in einer dunklen Flasche im Kühlschrank
(+ 4° C) aufbewahrt.

Durchführung der Bestimmung: Die aufgetauten Urinproben wurden aus
der Plastikflasche in einen 1 l Meßkolben übergeführt. Eventuelle Ver-
unreinigungen des Urins (Futterreste, Tierhaare) wurden durch Glas-
wolle abfiltriert. Der Kolben wurde mit physiologischer Kochsalzlösung
bis zur Marke aufgefüllt, gut umgeschüttelt, und ein Teil seines Inhal-
tes wurde mit physiol. NaCl im Verhältnis 1 : 50 weiterverdünnt - bei
den Urinproben der Tiergruppe III_O bzw. III_{Mn} im Verhältnis 1 : 100.
Diese Verdünnung wurde für folgenden Bestimmungsansatz verwendet:

Blindprobe (1x) : 0,1 ml Urease-Suspension

Probe A (2x) : 0,1 ml Urease-Suspension + 0,2 ml Harnstoff-
-Standardlösung

Probe B (3x) : 0,1 ml Urease-Suspension + 0,2 ml verdünnte
Urinprobe

++ Urease-Mischung zur Harnstoffbestimmung, Asid-Institut GmbH
München

+ Natriumhypochloritlösung zur Harnstoffbestimmung,
Asid-Institut GmbH, München

Um auch den Anteil an präformiertem Ammoniak (d. h. an Ammoniak, welcher schon vor der Ureaseeinwirkung im Urin vorhanden war) zu erfassen, wurden bei jeder Bestimmung 2 weitere Proben mitgeführt:

Probe C (2x) : 0,2 ml verdünnte Urinprobe

Probe D (1x) : 0,2 ml aqua bidest.

Die Proben wurden nach dem Einpipettieren gut gemischt, die Reagenzgläser mit Stopfen versehen und für 15 Minuten bei 37° C im Wasserbad inkubiert. Anschließend wurde in alle Proben nacheinander 5 ml der Lösung 1 und 5 ml der Lösung 2 einpipettiert. Nach Zugabe der Lösung 2 wurde sofort gründlich gemischt und für weitere 30 Minuten bei 37° C inkubiert. Nach kurzem Abkühlen der Proben in Eiswasser wurde die Farbintensität gemessen. (Schichtdicke: 10 mm, Wellenlänge: 546 nm, Eppendorf-Photometer).

Berechnung des Harnstoffgehaltes: Von der Extinktion der Probe A und der Probe B wird die Extinktion des Blindwertes abgezogen. Durch Bildung der Differenz Ext. C - Ext. D erhält man die Extinktion, welche durch das präformierte NH_3 hervorgerufen wurde. Dieser Wert muß von der Extinktion der Probe B subtrahiert werden. Da die Farbintensität der Proben A und B ihrem Harnstoffgehalt linear proportional ist, gilt:

$$\frac{\text{Ext. A}}{6 \mu\text{g}^{+})} = \frac{\text{Ext. B}}{x \mu\text{g}} \quad +) \text{ 0,2 ml der Harnstoff-Standardlg. enthalten 6 } \mu\text{g Harnstoff}$$

oder

$$\frac{\text{Ext. B} \cdot 6 \mu\text{g}}{\text{Ext. A}} = \mu\text{g Harnstoff in 0,2 ml verdünnter Urinprobe}$$

A 2.2.5.5. Bestimmung der Mangankonzentration im Versuchsfutter und im Leberhomogenat

Die Mangankonzentration der Proben wurde mit Hilfe der Atomabsorptionsspektralphotometrie bestimmt (Beckman-Gerät 979, DB-G mit AAS-Zusatz und Laminarbrenner mit geheizter Mischkammer).

Als Standardlösung diente eine "Titrisol"-Standardlösung von Merck mit 1,000 g Mangan / l. Aus ihr wurden durch Verdünnen Eichwerte zwischen 0,1 und 1,0 $\mu\text{g Mn/ml}$ hergestellt.

Vorbereitung der Proben: a) Versuchsfutter: Je 3 g Versuchsfutter wurde in Quarztiegel eingewogen und im Muffelofen bei 450⁰ C verascht. 40 mg (Mn-Mangelfutter) bzw. 10 mg (Futter mit 50 ppm Mn) der Asche wurde in 5 ml einer 1,4 N HCl⁺ gelöst und anschließend mit H₂O bidest. auf 10 ml aufgefüllt. Diese Lösung wurde für die Analyse verwendet.

b) Leberhomogenat: Das nach der enzymatischen Bestimmung übriggebliebene Homogenat I wurde gefriergetrocknet⁺⁺. Anschließend wurde die getrocknete Leber in Quarztiegel eingewogen und bei 450⁰ C im Muffelofen verascht. Je 40 mg der erhaltenen Asche wurde in gleicher Weise wie beim Futter weiterverarbeitet.

+ isotherm destillierte HCl- eigene Herstellung
++ Phywe-Laborgefrier-trocknungsanlage

A 2.3. Versuchsergebnisse

A 2.3.1. Gewicht und Proteinkonzentration der Leber

Wie sich die unterschiedliche Mangan- und Proteinversorgung auf das Gewicht und den Proteingehalt der Leber auswirkte, ist aus Tabelle 2 ersichtlich:

Tabelle 2: Lebergewicht und Proteingehalt der Leber in Abhängigkeit von der Mangan- und der Proteinzufuhr

Tier- gruppe	An- zahl der Tiere	Mn-Gehalt der Kost (mg/kg)	Protein- konz. der Kost (g/100 g)	Lebergewicht/ Körpergewicht (g/100 g)	Proteinkonz. der Leber (g/100 g)
I _O	10	< 1	10	2,27 ± 0,17 ⁺	18,8 ± 1,4
II _O	9	< 1	20	2,33 ± 0,17	19,3 ± 1,3
III _O	10	< 1	60	2,45 ± 0,32	19,8 ± 1,2
I _{Mn}	9	50	10	2,16 ± 0,09	18,8 ± 1,2
II _{Mn}	9	50	20	2,23 ± 0,22	19,0 ± 0,6
III _{Mn}	9	50	60	2,24 ± 0,24	19,3 ± 1,2

+) Mittelwert der Gruppe ± Standardabweichung

Wie aus Tabelle 1 zu ersehen ist, nehmen mit höherer Proteinzufuhr auch das Gewicht und der Proteingehalt der Leber zu. Allerdings sind die Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen nur in einem Falle signifikant⁺⁺). (Lebergewicht: I_{Mn} - III_{Mn}, P < 1 %)

++) Als signifikant werden im folgenden Differenzen bezeichnet, bei denen P ≤ 5 % ist. Die Bewertung erfolgte nach Student's t-Test (62)

Der Unterschied in der Manganversorgung hatte - wie erwartet - keinen Einfluß auf das Gewicht und den Proteingehalt der Leber. Die etwas höheren Werte für das Lebergewicht je 100 g Körpergewicht in der Manganmangel-Gruppe sind wahrscheinlich darauf zurückzuführen, daß das durchschnittliche Körpergewicht der Mangeltiere etwas niedriger lag als jenes der vollversorgten Tiere.

A 2.3.2. Retention von Mangan in der Leber

Tabelle 3: Mangankonzentration in der Leber in Abhängigkeit von der Manganzufuhr

Tiergruppe	Anzahl der Tiere	Mn-Gehalt der Kost (mg/kg)	Mangankonzentration in der Leber	
			µg Mn / 100 g Frischsubstanz	µg Mn / g Asche
Manganmangel-Gruppen (I _O , II _O , III _O)	29	< 1	25,5 ± 7,4	17,1 ± 5,2
Mangan-vollversorgte Gruppen (I _{Mn} , II _{Mn} , III _{Mn})	27	50	119,1 ± 22,9	80,8 ± 16,7

Die Ergebnisse der Tabelle 3 zeigen einen deutlichen Zusammenhang zwischen der alimentären Manganzufuhr und der Retention von Mangan in der Leber. Die Mangankonzentration der Leberasche war bei der mit Mangan vollversorgten Gruppe beinahe fünfmal so hoch wie bei der Mangel-Gruppe. Die Differenz war bei $P < 0,1 \%$ signifikant. Die Höhe der Proteinaufnahme hatte erwartungsgemäß keinen Einfluß auf die Mangan-Retention in der Leber.

A 2.3.3. Aktivität der Leberarginase

Die Auswirkungen der unterschiedlichen Mangan- und Proteinzufuhr auf die Aktivität der Leberarginase werden in Tabelle 4 wiedergegeben:

Tabelle 4: Aktivität der Leberarginase in Abhängigkeit von der Mangan- und der Proteinzufuhr

Tier-Gruppe	Anzahl der Tiere	Arginin-Umsatz (ohne in vitro Zusatz von Mn^{2+})		
		m Mol Arginin pro 100g Frischsubstanz	μ Mol Arginin pro 100 mg Leberprotein	m Mol Arginin pro 100 g Körpergewicht
I _O	10	88,3 $\pm$ 8,0	471,3 $\pm$ 45,9	2,004 $\pm$ 0,219
II _O	9	91,2 $\pm$ 4,2	480,4 $\pm$ 24,4	2,131 $\pm$ 0,139
III _O	10	101,0 $\pm$ 7,5	511,2 $\pm$ 46,0	2,433 $\pm$ 0,331
I _{Mn}	9	127,3 $\pm$ 9,7	677,3 $\pm$ 57,3	2,749 $\pm$ 0,208
II _{Mn}	9	125,2 $\pm$ 13,7	640,1 $\pm$ 64,2	2,802 $\pm$ 0,289
III _{Mn}	9	133,0 $\pm$ 9,8	687,9 $\pm$ 55,4	3,237 $\pm$ 0,475

A 2.3.3.1. Einfluß der Manganzufuhr auf die Arginase-Aktivität:

Parallel zu der hohen Mangankonzentration in der Leber ist auch die Arginaseaktivität bei den Tieren der mit Mangan vollversorgten Gruppen (I_{Mn}, II_{Mn}, III_{Mn}) deutlich erhöht gegenüber der Arginaseaktivität der Mangel-Gruppen (I_O, II_O, III_O). Der Arginnumsatz (m Mol/100 g Körpergewicht) liegt bei der:

Gruppe I_{Mn} um 37 % höher als bei der Gruppe I_O
 Gruppe II_{Mn} um 32 % höher als bei der Gruppe II_O
 Gruppe III_{Mn} um 33 % höher als bei der Gruppe III_O

Alle Differenzen sind bei $P < 0,1$ % signifikant.

Zugabe von Mangan in vitro bewirkte bei allen Gruppen eine signifikante Steigerung des Arginin-Umsatzes (s. Tab. 5). Obwohl die Umsatzsteigerung bei den Gruppen mit der niedrigen Manganzufuhr etwa das Doppelte der Erhöhung bei den Mangan-vollversorgten Gruppen betrug - 78 % gegenüber 42 % - wurde das Niveau der Gruppen I_{Mn} , II_{Mn} , III_{Mn} nicht erreicht. Die Differenz zwischen den korrespondierenden Gruppen ($I_O - I_{Mn}$; $II_O - II_{Mn}$; $III_O - III_{Mn}$) war bei $P < 1\%$ signifikant. Hieraus könnte vermutet werden - da Mangan-Ionen mit Sicherheit im Überschuß zugesetzt wurden -, daß bei dem alimentären Manganmangel die Konzentration des Enzymproteins vermindert ist.

Tabelle 5: Aktivität der Leberarginase ohne und mit Mn^{2+} -Zusatz in vitro

Tiergruppe	Anzahl der Tiere	μ Mol Arginin pro 100 mg Leberprotein	
		ohne Mn^{2+}	mit Mn^{2+}
I_O	10	471,3 $\pm$ 45,9	873,3 $\pm$ 72,0
II_O	9	480,4 $\pm$ 24,4	858,0 $\pm$ 35,0
III_O	10	511,2 $\pm$ 46,0	858,6 $\pm$ 53,1
I_{Mn}	9	677,3 $\pm$ 57,3	972,6 $\pm$ 70,7
II_{Mn}	9	640,1 $\pm$ 64,2	940,6 $\pm$ 50,6
III_{Mn}	9	687,9 $\pm$ 55,4	939,1 $\pm$ 36,3

A 2.3.3.2. Einfluß der Proteinzufuhr auf die Arginaseaktivität:

Wie aus Tabelle 4 hervorgeht, wirkte sich die unterschiedliche Proteinzufuhr - überraschenderweise - in viel geringerem Maße auf die Arginaseaktivität aus als die unterschiedliche Manganzufuhr. Eine Abhängig-

keit der Arginaseaktivität von der Proteinzufuhr war nicht in allen Fällen feststellbar. Die Versorgung mit 10 % Kasein im Futter gegenüber 20 % Kasein im Futter (Tiergruppe: $I_{Mn} - II_{Mn}$, $I_O - II_O$) rief keine signifikanten Differenzen der Arginaseaktivität hervor. Dagegen zeichnete sich eine deutliche Erhöhung der Arginaseaktivität bei der Tiergruppe III_{Mn} bzw. III_O (60 % Kasein) gegenüber den Tiergruppen I_{Mn} und II_{Mn} bzw. I_O und II_O ab. - Folgende Unterschiede in der Arginaseaktivität sind signifikant:

m Mol Arginin/100 g Frischsubstanz:	$I_O - III_O$ ($P < 1 \%$)
	$II_O - III_O$ ($P < 0,2 \%$)
m Mol Arginin/100 g Körpergewicht:	$I_{Mn} - III_{Mn}$ ($P < 5 \%$)
	$II_{Mn} - III_{Mn}$ ($P < 5 \%$)
	$I_O - III_O$ ($P < 5 \%$)
	$II_O - III_O$ ($P < 5 \%$)

Bemerkenswert ist, daß sich eine deutliche Korrelation zwischen Proteinzufuhr und Arginaseaktivität gerade dann zeigt, wenn der Argininumsatz auf 100 g Körpergewicht bezogen wird. Dies ist - physiologisch gesehen - die richtige Bezugsbasis, da sich das Futterangebot - und damit die Proteinzufuhr innerhalb einer Gruppe - nach dem Körpergewicht des Versuchstieres richtete.

Der Argininumsatz (m Mol/100 g Körpergewicht) war bei:

Gruppe III_O	um 21 % höher als bei Gruppe I_O
Gruppe III_O	um 14 % höher als bei Gruppe II_O
Gruppe III_{Mn}	um 18 % höher als bei Gruppe I_{Mn}
Gruppe III_{Mn}	um 16 % höher als bei Gruppe II_{Mn}

Die durch das hohe Proteinangebot hervorgerufene Aktivitätssteigerung der Arginase ist prozentuell etwa nur halb so groß wie die Steigerung der Arginaseaktivität durch die erhöhte Manganzufuhr. Aus diesem Grunde liegt der Argininumsatz der Gruppe III_O immer noch um 12 % niedriger als der Argininumsatz der Gruppe I_{Mn} .

Die durch den Manganmangel bedingte Depression der Arginaseaktivität konnte durch die aktivitätssteigernde Wirkung eines hohen Proteinangebotes also nicht ausgeglichen werden.

A 2.3.4. Einfluß der Protein- und Manganzufuhr auf die Harnstoffausscheidung

Die im Urin ausgeschiedene Harnstoffmenge (s. Tab. 6) wurde auf die Futteraufnahme bezogen.

Tabelle 6: Exkretion von Harnstoff im Urin in Abhängigkeit von der Mangan- und Proteinzufuhr

Tiergruppe	Anzahl der Tiere	Harnstoffausscheidung (mg/g Futter)
I _O	10	22,7 ± 2,3
II _O	9	50,6 ± 2,7
III _O	10	157,9 ± 10,8
I _{Mn}	9	23,4 ± 3,0
II _{Mn}	9	50,1 ± 3,5
III _{Mn}	9	154,6 ± 8,0

Wie aus den Werten hervorgeht, war die Harnstoffausscheidung eindeutig vom Proteingehalt der Kost abhängig. Die Zufuhr der doppelten bzw. sechsfachen Menge an Protein rief auch eine entsprechende Vervielfachung der renalen Harnstoff-Exkretion hervor. Es zeigte sich außerdem - betrachtet man die Manganmangel-Gruppen und die Mangan-vollversorgten Gruppen getrennt für sich - daß die Harnstoffausscheidung mit der durch unterschiedliche Proteingaben beeinflussten Arginaseaktivität

(Argininsatz/100 g Körpergewicht) korreliert war (s. Tab. 4).

Interessanter - im Hinblick auf unsere Problemstellung - ist die Frage, wie sich die unterschiedliche Manganzufuhr auf die Harnstoffausscheidung ausgewirkt hat. Bei Betrachtung der in Tab. 6 wiedergegebenen Ergebnisse fällt auf, daß sich die Harnstoffausscheidung der Manganmangel-Gruppen und die Harnstoffausscheidung der im Proteingehalt entsprechenden Mangan-vollversorgten Gruppen ($I_{Mn} = I_O$, $II_{Mn} = II_O$, $III_{Mn} = III_O$) nicht voneinander unterschieden.

Die Erniedrigung der Arginaseaktivität durch das manganarme Futter (s. Tab. 4) hat also keinen hemmenden Einfluß auf die Harnstoffsynthese gehabt. - Es besteht demnach keine Abhängigkeit der Harnstoffausscheidung von der Arginaseaktivität, wenn letztere durch verschiedenen hohe Mangangaben auf unterschiedliche Niveaus eingestellt wurde. Das ist umso mehr bemerkenswert, da die Arginaseaktivität durch die unterschiedliche alimentäre Manganzufuhr in weitaus stärkerem Maße beeinflusst wurde als durch die unterschiedliche Proteinzufuhr.

A 2.3.5. Einfluß der Mangankonzentration auf die Aktivität der Arginase in vitro

Die Aktivität der Arginase als Funktion der Mangankonzentration ist in Abb. 1 dargestellt. Für unsere Fragestellung ist lediglich jener Konzentrationsbereich des Aktivators von Interesse, der mit den im Lebergewebe vorkommenden Konzentrationen größenordnungsmäßig übereinstimmt ("physiologischer" Konzentrationsbereich). Zur Festlegung dieses Bereiches diente die Konzentration des Mangans in den Ansätzen, die Leberhomogenat enthielten (s. A 2.2.5.2.):

Die Konzentration von Mn^{2+} in den Ansätzen mit Homogenat der Gruppe O als untere Grenze und mit Homogenat der Gruppe Mn als obere Grenze des zu betrachtenden Konzentrationsbereiches für Mn^{2+} . Bei Festlegung der Konzentrationsbereiche wurde die Proteinkonzentration der Ansätze sowie der Anreicherungs faktor des Präparates be-

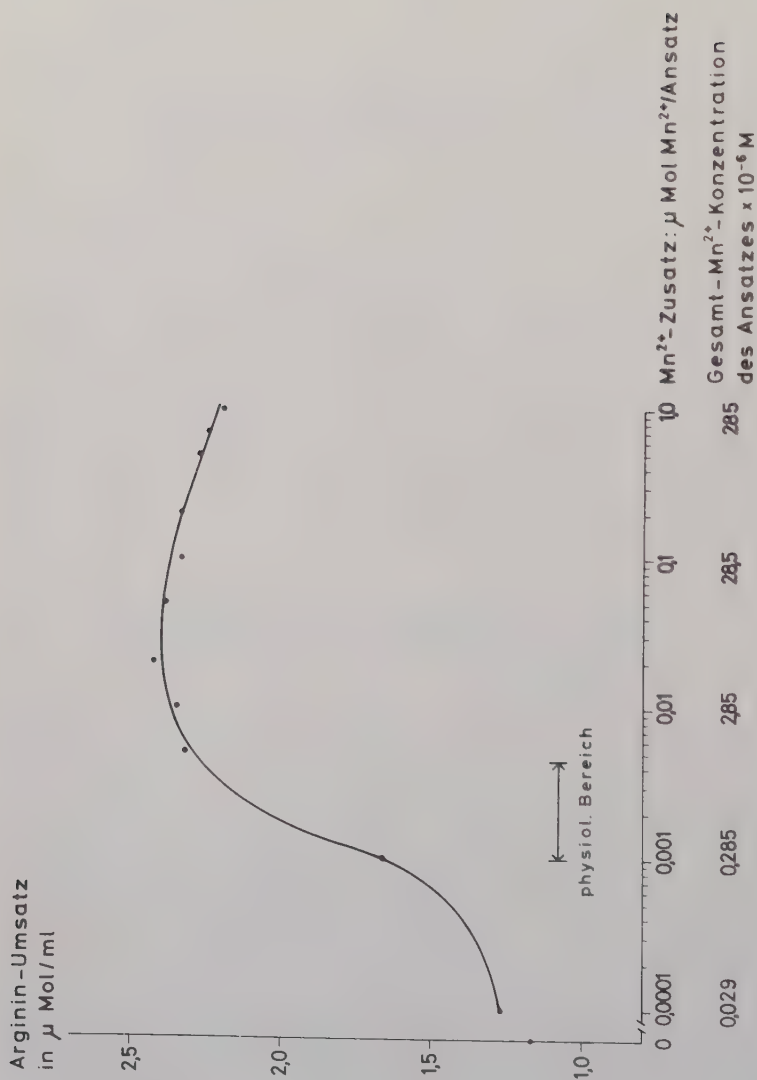


Abb. 1: Aktivität der Arginase als Funktion der Mn^{2+} -Konzentration im Ansatz

rücksichtigt. "Physiologisch" interessant sind demnach die Aktivierungseffekte, die in der linken Hälfte der Aktivierungskurve zur Darstellung kommen, d.h. der Bereich zwischen $0,3 \cdot 10^{-6}$ und $1,2 \cdot 10^{-6}$ M. Wie Abb. 1 zeigt, wirken Mn^{2+} -Ionen schon in Konzentrationen, die niedriger sind als die untere Grenze des "physiologischen" Konzentrationsbereiches, aktivierend auf die Arginase. Die Aktivität des Enzyms erreichte bei einer Mangankonzentration von ca. $5,7 \cdot 10^{-6}$ M ihr Maximum. Der relative Aktivitätsanstieg zwischen der unteren Grenze der "physiologischen" Mangankonzentration ($0,3 \cdot 10^{-6}$ M) und ihrer oberen Grenze ($1,2 \cdot 10^{-6}$ M) betrug etwa 26 %.

A 2.4. Diskussion der Ergebnisse

Die Abhängigkeit der katalytischen Aktivität der Leberarginase von der alimentären Manganzufuhr der Ratte konnte in den vorliegenden Untersuchungen bestätigt werden. Die Tiergruppen ($I_{Mn}, II_{Mn}, III_{Mn}$), welche 50 ppm Mangan im Futter erhielten, hatten eine um 30 - 40 % höhere Arginaseaktivität als die Mangelgruppen (I_O, II_O, III_O), deren Futter weniger als 1 ppm Mangan enthielt (s. Tab. 4). Dieses Ergebnis stimmt mit dem Resultat vergleichbarer Untersuchungen von Rehner u.a. (47) (48) gut überein, bei denen die mit Mangan vollversorgte Gruppe (50 ppm Mn im Futter) eine Aktivitätssteigerung von ca. 30 % gegenüber der Mangelgruppe (1 ppm Mn im Futter) aufwies.

Auch die Proteinversorgung hatte in unserem Versuch einen ausgeprägten Einfluß auf die Arginaseaktivität - wie er aufgrund der Arbeiten mehrerer Autoren erwartet wurde. Allerdings rief die unterschiedliche Proteinzufuhr geringere Differenzen in der Arginaseaktivität hervor, als es in den Untersuchungen von Mandelstam (38) und Schimke (52) der Fall war. Mandelstam stellte beim Übergang von 17 % zu 67 % Protein in der Kost einen Anstieg der Arginaseaktivität um 78 % fest, Schimkes Ergebnisse zeigen bei einem Vergleich der Tiergruppe mit 15 % Protein im Futter mit der Gruppe, die 60 % Protein im Futter

erhielt, eine Steigerung der Arginaseaktivität um 70 %. In unseren Versuchen betrug die relative Differenz des Argininiumsatzes zwischen den Tiergruppen I_O bzw. I_{Mn} (10 % Protein) und den Tiergruppen III_O bzw. III_{Mn} (60 % Protein) nur 18 bzw. 21 % (s. Tab. 4). Mit diesen Werten stimmen wiederum gut die Ergebnisse von Lightbody u.a. (35) überein, die ebenfalls im Versuch an Ratten - nach einer Umstellung von 6 % auf 60 % Protein im Futter - einen Anstieg der Arginaseaktivität um 14 % feststellten. Bemerkenswert ist, daß sowohl die von Lightbody als auch die von uns verwendeten Versuchstiere weiblich und geschlechtsreif waren, während Schimke und Mandelstam sehr junge männliche Tiere verwendeten.

Nach Ansicht von Schimke beruhen die - durch verschiedene Kostformen hervorgerufenen - Änderungen in der Arginaseaktivität hauptsächlich auf einer Erhöhung oder Verminderung der Abbaurate des Enzyms (53). Diese Abbaurate wird durch die Zufuhr von Substraten oder Kofaktoren beeinflusst. Eine hohe Konzentration an Substrat bzw. Kofaktor vermindert die Abbaurate, wirkt sich also stabilisierend auf das Enzymprotein aus, während die Syntheserate des Enzyms gleich bleibt. Dadurch kommt es zur Anhäufung des Enzymproteins, so daß eine erhöhte Enzymaktivität gemessen wird. Eine niedrige Konzentration an Substrat bzw. Kofaktor erhöht die Abbaurate, und da die Syntheserate gleich bleibt, resultiert daraus eine verminderte Enzymaktivität. Möglicherweise wird die Arginaseaktivität nicht nur durch die Höhe der alimentären Proteinzufuhr - wie von Schimke festgestellt - sondern auch durch die Höhe der Manganversorgung auf diesem Wege beeinflusst. Allerdings ist dies nicht der einzige Mechanismus über den eine Beeinflussung der Aktivität durch Mn denkbar wäre.

Die kombinierte Zufuhr von unterschiedlich hohen Mangan- und Proteingaben in unseren Versuchen hat gezeigt, daß selbst bei einer Versorgung mit 60 % Protein im Futter die Arginaseaktivität in der Manganimangel-Gruppe nicht mehr auf das Niveau der vollversorgten Gruppe gehoben werden konnte (vergl. Gr. III_O und I_{Mn}, Tab. 4). Ob dieses

Ergebnis zur Schlußfolgerung berechtigt, daß Mangan - als Kofaktor der Arginase - eine größere Bedeutung für die Stabilisierung des Apoenzyms hat als das Protein - als Substrat - kann nicht ohne weiteres entschieden werden.

Vergleicht man die Arginaseaktivität und die Harnstoffausscheidung bei unterschiedlicher Manganzufuhr, so kann keine Parallelität zwischen beiden festgestellt werden. Trotz der wesentlich niedrigeren Arginaseaktivität der Manganmangelgruppen (s. Tab. 4) wurde von den Tieren dieser Gruppen genau die gleiche Menge an Harnstoff ausgeschieden, wie von den entsprechenden Paralleltieren in den mit Mangan vollversorgten Gruppen mit wesentlich höherer (30 - 40 %) Arginaseaktivität (s. Tab. 6). Die Menge des synthetisierten Harnstoffs war lediglich von der Proteinzufuhr und damit der zum Abbau zur Verfügung stehenden Proteinmenge abhängig. Durch die Manganversorgung wurde also die Kapazität des Organismus für die Biosynthese des Harnstoffs nicht beeinflusst. Nach Untersuchungen von Schimke (52) ist von allen Enzymen des Harnstoffzyklus die Arginase in größter Menge vorhanden. Anscheinend ist der Überschuß an diesem Enzym so groß, daß eine Verminderung seiner Aktivität in einer Größenordnung, wie sie durch Manganmangel hervorgerufen wird, ohne physiologische Bedeutung bleibt.

Aufgrund der Korrelation, die sie zwischen der Arginaseaktivität und der Harnstoffausscheidung bei verschiedener Proteinzufuhr feststellen konnten, äußern Ashida (1) und Schimke (52) die Auffassung, daß die Erhöhung bzw. Verminderung der Arginaseaktivität eine Anpassung an die erforderliche Intensität des Proteinabbaus und damit der Harnstoffsynthese darstellt. Schimke schreibt: "... the levels of enzyme activities are related to the extent to which particular reactions or pathways are utilized, as has been shown quantitatively in the relationship of contents of urea cycle enzymes to protein intake and urea excretion".

Aufgrund der oben diskutierten Ergebnisse unserer Untersuchungen erscheint diese Hypothese nicht sehr wahrscheinlich. Für eine Erhöhung

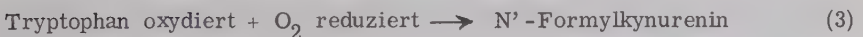
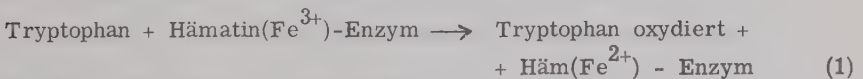
der Arginaseaktivität bei vermehrter Proteinzufuhr scheint keine unbedingte Notwendigkeit zu bestehen, konnte doch der Abbau größerer Proteinmengen (60 % der Kost) auch dann ungestört ablaufen, wenn die Arginaseaktivität infolge Manganmangel relativ niedrige Werte aufwies. Die Parallelität zwischen Proteinzufuhr und Arginaseaktivität wäre demnach nicht im Sinne einer Adaptation zu interpretieren, sondern wahrscheinlich lediglich als Folge des bereits erwähnten stabilisierenden Effektes des Proteins zu deuten.

Zu den Zielsetzungen der Untersuchung gehörte auch das Klären der Frage, inwieweit die Aktivierung der Arginase *in vitro* durch Mangan in verschiedenen Konzentrationen das Verhalten des Enzyms bei alimentärer Zufuhr des Nährstoffs Mangan erklärt. Eine *in vivo*-Wirkung eines Effektors ist nur dann zu erwarten, wenn die kinetischen Eigenschaften eines Enzyms durch Effektorkonzentrationen beeinflussbar sind, die normalerweise am Wirkungsort des Enzyms, z.B. in den Zellen bestimmter Gewebe, anzutreffen sind ("physiologische" Konzentrationen). Wie aus Abb. 1 zu entnehmen ist, betrug der relative Aktivitätsanstieg der Arginase zwischen der unteren und oberen Grenze des "physiologischen" Konzentrationsbereiches 26 %. In durchaus vergleichbarer Größenordnung - zwischen 32 % und 37 % - bewegte sich die relative Aktivitätsdifferenz der Arginase *in vivo* beim Vergleich der Arginaseaktivität in den Lebern der Mangan-Mangeltiere und der mit Mangan vollversorgten Tiere. Die *in vitro* feststellbaren kinetischen Eigenschaften des Systems Arginase - Mangan stehen in Einklang mit dem Verhalten der Arginase *in vivo* bei alimentärer Zufuhr des Mangans.

Teil B : Tryptophan-Pyrrolase (EC 1.11.1.4.)

B 1. Literaturübersicht

Die Tryptophan-Pyrrolase (L-Tryptophan : H_2O_2 -Oxidoreduktase) ist eine Oxigenase. Sie katalysiert die oxidative Spaltung des Pyrrolringes des L-Tryptophans, wobei N'-Formylkynurenin entsteht (26). Das Enzym kommt in Bakterien (*Pseudomonas* (23)) und in Säugetierlebern vor, wo es im Zellsaft lokalisiert ist (22). Die Tryptophan-Pyrrolase benötigt als Kofaktor ein Eisen (III)-Protoporphyrin (60), das sich überwiegend in den Mikrosomen befindet und von dort aus an den Zellsaft abgegeben wird (14). Der Kofaktor weist dem Hämatin sehr ähnliche Eigenschaften auf oder ist möglicherweise damit identisch (24). Im Leberzellsaft liegt die Tryptophan-Pyrrolase in drei Formen vor: als Apoenzym ohne prosthetische Gruppe, als Ferriprophyrin-Enzym und als Ferroprophyrin-Enzym (15). Untersuchungen mit Tryptophan-Pyrrolase aus *Pseudomonas*, die in ihren Eigenschaften der Tryptophan-Pyrrolase aus Rattenleber sehr ähnlich ist, ergaben Hinweise darauf, daß für die katalytische Wirksamkeit des Enzyms das Eisenion des Protoporphyrins in der reduzierten Form vorliegen muß. Ferner wird angenommen, daß H_2O_2 oder Ascorbinsäure zur Reduktion des Eisenprotoporphyrins nötig ist (60) (27). Nach Untersuchungen von Feigelson (15) (13) scheint es jedoch möglich, daß während des Ablaufes der enzymatischen Katalyse das Eisen(III)-Ion des Enzymkomplexes durch Tryptophan selber reduziert und anschließend durch Sauerstoff wieder oxydiert wird. Er vermutet folgenden Reaktionsmechanismus (12):



Unter den Effektoren der Tryptophan-Pyrrolase wurde von den meisten Autoren, die über dieses Enzym gearbeitet haben, in erster Linie der Eisen(III)-Protoporphyrin-Kofaktor beachtet. Eine Reihe von Arbeiten (14) (28) (20) berichten über eine starke Erhöhung der Umsatzrate, hervorgerufen durch einen Zusatz von Hämatin, Methämoglobin oder Mikrosomen zum Reaktionsmedium.

Hinweise darauf, daß auch Mn^{2+} -Ionen in vitro eine aktivierende Wirkung auf die Tryptophan-Pyrrolase ausüben, liefern die Arbeiten von Pitot und Cho (45) und von Chytil und Skřivanová (3) (4). Pitot und Cho (45) bereiteten Rattenleberhomogenat durch Zentrifugieren und Ausfällen in der Weise auf, daß sie die Mikrosomenfraktion und getrennt davon den Überstand - frei von Tryptophan-Pyrrolase-Aktivität - erhielten. Diese beiden Zellfraktionen wurden wieder zusammengegeben und mit ATP, Mn^{2+} -Ionen ($3 \mu\text{Mol}/4 \text{ ml}$) und 3-Phosphoglycerat (zur Regeneration des ATP) bei 37°C und pH 7,2 20 Minuten lang vorinkubiert. Danach wurde die Mikrosomenfraktion abzentrifugiert. Die anschließende Bestimmung der Tryptophan-Pyrrolase-Aktivität in dem Überstand ergab hohe Werte. Dagegen zeigte sich keine oder nur eine geringe Aktivität, wenn beim Vorinkubieren Mn^{2+} , ATP oder 3-Phosphoglycerat aus dem Ansatz fortgelassen wurden. Mg^{2+} -Ionen hatten erst in 10fach höherer Konzentration die aktivierende Wirksamkeit der Mn^{2+} -Ionen. Spätere Untersuchungen ergaben, daß während der Vorinkubation des vollständigen Ansatzes in der Überstand-Fraktion der Proteingehalt anstieg, wobei die Mikrosomenfraktion die Quelle für dieses Protein darstellte. Pitot und Cho deuten diese - durch ATP und Mangan hervorgerufene - Aktivierung der Tryptophan-Pyrrolase als ein energieabhängiges Lösen des Enzyms von der Mikrosomenfraktion.

Die aktivierende Wirkung von Mn^{2+} -Ionen auf die Tryptophan-Pyrrolase in Rattenleber-Zellsaft beschreiben Chytil und Skřivanová (3). Zur Gewinnung des Zellsaftes wurde Rattenleberhomogenat bei $54000 \times g$ eine Stunde lang bei 0°C zentrifugiert. In dieser Rohpräparation wurde die Aktivität der Tryptophan-Pyrrolase bei Zusatz unterschiedlicher Mn^{2+} -Mengen ($0,03 \mu\text{Mol}$ -, $0,3 \mu\text{Mol}$ -, $3 \mu\text{Mol}$ -, $30 \mu\text{Mol}$ -, $300 \mu\text{Mol}$

pro 4 ml Ansatz) bei pH 7,2 bestimmt. Dabei zeigte sich, daß die Mangan-Ionen ab 0,3 μ Mol bis zu einem Zusatz von 3 μ Mol einen aktivierenden Effekt auf das Enzym hatten. Höhere Konzentrationen an Mangan hemmten das Enzym. Die maximale Aktivierung der Tryptophan-Pyrrolase wurde bei einem Zusatz von 3 μ Mol Mn^{2+} pro Ansatz erzielt. Diese optimale Mn^{2+} -Konzentration bewirkte eine Erhöhung der Umsatzrate des Enzyms um ca. 85 % (33 - 193 %) gegenüber dem Enzym ohne Mn^{2+} -Zusatz.

In einer weiteren Veröffentlichung (4) beschreiben die beiden Autoren die Reaktivierung von hitzeinaktivierter Tryptophan-Pyrrolase durch einen Zusatz von Mangan und ATP. Durch Zentrifugation von Leberhomogenat bei 75000 x g gewonnener Zellsaft wurde bei 38° C 1 Stunde lang vorinkubiert. Anschließend wurde in dem Ansatz die Aktivität der Tryptophan-Pyrrolase bestimmt - und zwar einmal ohne und einmal mit Zugabe von ATP und $MnSO_4$. Während der Vorinkubation verminderte sich die Aktivität des Enzyms um etwa die Hälfte der ursprünglichen Aktivität. Wurden dem Bestimmungsansatz nachträglich ATP und Mangan-Ionen zugesetzt, so resultierte daraus ein signifikantes Ansteigen der Aktivität und zwar bis zur Höhe des Wertes vor der Inkubation. Bei Ersatz der Mn^{2+} -Ionen durch Magnesium war diese Reaktivierung nicht festzustellen. Chytil und Skřivanová vermuten für diesen Übergang der Tryptophan-Pyrrolase aus der inaktiven in die aktive Form einen ähnlichen Mechanismus wie Pitot und Cho (45).

B 2. Eigene Versuche

B 2.1. Problemstellung

Über das in vivo-Verhalten der katalytischen Aktivität der Tryptophan-Pyrrolase in Abhängigkeit von der Manganversorgung des Organismus sind keine Untersuchungen bekannt. Zielsetzung unserer Versuche war es, folgende Fragen zu klären:

1. Beeinflußt die alimentäre Zufuhr von Mangan in unterschiedlicher Dosierung die Aktivität der Tryptophan-Pyrrolase in der Leber?
2. Wie verhält sich unter unseren Versuchsbedingungen die Aktivität der Tryptophan-Pyrrolase als Funktion der Mangankonzentration in vitro und inwieweit ist dieses Verhalten zur Erklärung eventueller in vivo-Effekte geeignet?

B 2.2. Versuchsanordnung, Material und Methoden

B 2.2.1. Versuchstiere, Tierhaltung und Versuchskost

Als Versuchstiere dienten 45 weibliche Wistar-Ratten⁺, die bei Versuchsbeginn ca. 40 - 50 g schwer waren. Die Tierhaltung erfolgte in gleicher Weise, wie bei A 2.2.1. beschrieben. Die Ratten wurden mit der gleichen Versuchskost gefüttert, die auch im Teil A der Arbeit während der Vorversuchsperiode verwendet wurde. Das Futter der Manganmangel-Gruppe enthielt durchschnittlich 0,4 mg Mn je kg, das Futter der Mangan-vollversorgten Gruppe 50 mg Mn je kg.

B 2.2.2. Versuchsanordnung

Nach einer einwöchigen Eingewöhnungszeit wurden die Tiere auf Grund ihres Körpergewichtes in zwei Gruppen eingeteilt und bildeten so eine

+) Züchter: Mayer-Arendt, Bad Salzufen

Manganmangel-Gruppe (Gruppe 0) und eine mit
Mangan-vollversorgte Gruppe (Gruppe Mn)

Am Ende der 160 täglichen Versuchsperiode zeigten die Manganmangel-
-tiere ein Durchschnittsgewicht von 286 g und die vollversorgten Tiere
ein Durchschnittsgewicht von 289 g.

B 2.2.3. Analytische Untersuchungsmethoden

B 2.2.3.1. Vorbereitung des Materials

Reagentien: Extraktionslösung aus 0,14 Mol KCl, 2,5 mMol NaOH
und 0,075 mMol DL-Tryptophan pro l

Am Ende des Versuches wurden die Tiere durch Decapitation getötet.
Die Leber wurde entnommen und nach dem Auskühlen (im Kühlschrank)
gewogen. Je 2,5 g zerkleinerte Leber und die 7fache Menge Extrak-
tionslösung (eisgekühlt) wurden im Messerkreuzhomogenisator 4 Minuten
lang homogenisiert. Der pH-Wert des Homogenats lag zwischen 7 und
7,5. Das Homogenat wurde 1/2 Stunde lang im Kühlschrank extrahiert
und anschließend im Kühlraum (+ 2⁰ C) 2 Stunden lang bei 48000 x g
zentrifugiert⁺⁺. Der Überstand wurde vorsichtig abpipettiert und bis
zur Bestimmung der Tryptophan-Pyrrolase-Aktivität am nächsten Mor-
gen im Kühlschrank bei + 2⁰ C aufbewahrt (15 Stunden).

B 2.2.3.2. Bestimmung der Tryptophan-Pyrrolase-Aktivität

Die Bestimmung der Tryptophan-Pyrrolase-Aktivität erfolgte nach der
Methode von Knox (25). Sie beruht auf folgendem Prinzip: Das während
der Inkubation durch die Tryptophan-Pyrrolase gebildete N'-Formyl-
kynurenin wird durch die in Rattenleber in starkem Überschuß vorhan-
dene Kynurenin-Formamidase zu Kynurenin und Formiat hydrolysiert.
Die Konzentration des Kynurenins kann auf Grund seiner Absorption

⁺⁺) Sorvall-Zentrifuge (SS 34 - Rotor)

bei 365 m μ spektrophotometrisch gemessen werden. Die während einer Zeitdauer von 1 - 3 Stunden unter konstanten Reaktionsbedingungen gebildete Kynureninmenge ist der Enzymaktivität proportional.

Reagentien:

0,1 M Lösung von $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ in aqua bidest

0,03 M L-Tryptophan-Lösung: 612 mg L-Tryptophan werden in ca. 80 ml aqua bidest unter Hinzufügen von ca. 1 ml NaOH (6 N) gelöst. Sofort anschließend wird die Lösung mit HCl auf pH 7 eingestellt und dann das Volumen mit Wasser auf 100 ml aufgefüllt. Die Lösung wurde im Kühlschrank (+ 4°C) aufbewahrt und jeden 3. Tag erneuert.

Na_2HPO_4 - NaH_2PO_4 - Puffer (0,2 M, pH 7)

1 N Natronlauge

15 (Gewicht) %ige meta-Phosphorsäure (1 ml dieser Säure muß mit 1 ml 1 N NaOH den pH-Wert 7 - 7,5 ergeben)

Die Säure wurde im Kühlschrank aufbewahrt und monatlich erneuert.

Durchführung der Bestimmung:

Der durch die Zentrifugation gewonnene Überstand wurde zusammen mit L-Tryptophan als Substrat bei pH 7 - dem pH-Optimum des Enzyms - und 37°C unter Schütteln und Luftzutritt⁺ inkubiert. Es wurden Parallelproben jeweils mit und ohne Zugabe von Mangan angesetzt. Die Höhe des Manganzusatzes betrug - im Hinblick auf die Arbeiten von Chytil und Skřivanová (3) - 3 μMol pro 4 ml Reaktionsmedium.

In Zentrifugengläser von 50 ml Inhalt wurde in folgender Reihenfolge einpipettiert:

2 ml Überstand

1 ml Na - PO_4 - Puffer

0,5 ml aqua bidest

0,5 ml L-Tryptophan-Lösung

Probe A (ohne Mn^{2+} -Zugabe in vitro) erhielt außerdem einen Zusatz von 30 μl aqua bidest. Probe B (mit Mn^{2+} -Zugabe in vitro) erhielt einen Zusatz von 30 μl MnSO_4 -Lösung. Der Blindwert enthielt die glei-

+) Eine Begasung mit O_2 brachte in Vorversuchen keine Erhöhung der Enzymaktivität

chen Zusätze wie Probe A, mit Ausnahme der Tryptophan-Lösung, die durch 0,5 ml aqua bidest ersetzt wurde. Für Probe A und Probe B wurden jeweils 3 Parallelansätze gemacht, für den Blindwert 2 Parallelansätze.

Nach genau 3 Stunden wurde die Reaktion durch Zugabe von 2 ml meta-Phosphorsäure gestoppt und der ausgefällte Niederschlag wurde abzentrifugiert (25 Min. bei 5000 U/Min.). Je 3 ml des Überstandes wurden vorsichtig abpipettiert und mit 1 ml 1 N NaOH neutralisiert. Gleich im Anschluß wurde die Absorption des gebildeten Kynurenins bei 365 m μ in 1 cm-Cuvetten gemessen (Zeiss-Spektralphotometer).

Berechnung der Enzymaktivität:

Die Extinktionsdifferenz zwischen Meßwert und Blindwert stellt das Maß für das gebildete Kynurenin dar. Kynurenin hat einen molaren Extinktionskoeffizienten von 4540. Eine Extinktion von 0,100 unter den obigen Bedingungen entspricht einer Kynureninmenge von 18,34 μ g in 3 ml des Proben-Überstandes, somit 36,68 μ g Kynurenin im gesamten Testansatz (63). Die Aktivität der Tryptophan-Pyrrolase wurde in μ g gebildetes Kynurenin / Ansatz und in μ g gebildetes Kynurenin / 100 mg Protein im Ansatz angegeben.

B 2.2.3.3. Bestimmung der Proteinkonzentration in der Leber und im zu den Ansätzen verwendeten Überstand

Der Proteingehalt des Homogenats und des Zentrifugations-Überstandes wurde nach der Methode von Lowry u.a. (37) ermittelt (Beschreibung der Methode und Durchführung der Bestimmung siehe A 2.2.5.3.). Für den Bestimmungsansatz wurde das Homogenat im Verhältnis 1 : 300, der Überstand im Verhältnis 1 : 200 verdünnt.

B 2.2.3.4. Bestimmung der Konzentration der Gesamtlipide in der Leber

Nach dem Zentrifugieren (s. B 2.2.3.1.) war bei einigen Überständen eine leichte Trübung festzustellen und die Tryptophan-Pyrrolase-Aktivität dieser Proben wich häufig vom Durchschnitt ab. Es wurde angenommen, daß die Trübung durch feinverteilte Fetttropfchen hervorgerufen wurde, deren Auftreten eventuell auf einen erhöhten Lipidgehalt der Leber hätte zurückgeführt werden können. Um festzustellen, ob zwischen der Tryptophan-Pyrrolase-Aktivität und dem Fettgehalt der Leber ein Zusammenhang besteht, wurde die Konzentration der Gesamtlipide in der Leber bestimmt. Die Lipidkonzentration wurde gravimetrisch ermittelt, durch Extraktion, Trocknung des Extraktes und Wägung.

Reagentien:

Gemisch Chloroform - Methanol im Verhältnis 2 : 1 (V/V)

Durchführung der Bestimmung:

Das nach Bestimmung der Tryptophan-Pyrrolase-Aktivität verbliebene Lebergewebe wurde gefriergetrocknet und anschließend in einem Achatmörser pulverisiert. Je 0,3 g dieses Trockenpulvers (entsprechend ca. 1 g Frischleber) wurde zusammen mit 15 ml Chloroform-Methanol-Gemisch 10 Minuten lang mit dem Potter-Elvehjem-Homogenisator homogenisiert (16). Anschließend wurde der Extrakt durch ein Blaubandfilter⁺ vom Rückstand abfiltriert. Homogenisierkolben und Pistill wurden mit 10 ml Gemisch abgespült, der Rückstand im Filter ebenfalls mit 10 ml Gemisch nachgewaschen. Das Filtrat wurde in einer Abdampfschale aufgefangen und das Lösungsmittel über einem siedenden Wasserbad abgedampft. Der verbleibende Lipidrückstand wurde bei 90° C 1/2 Stunde getrocknet und anschließend - nach Abkühlen im Exsikkator - gewogen. Eine weitere Reinigung des Rohextraktes unterblieb, da auf die genauen Absolutwerte kein Wert gelegt wurde.

+) Schleicher u. Schüll, Nr. 589³ Blauband ø 7 cm

Ergebnisse: Es bestand kein Zusammenhang zwischen der jeweils gemessenen Enzymaktivität und dem Lipidgehalt der Leber. Der durchschnittliche Fettgehalt (in % der Trockensubstanz) betrug

bei Gruppe 0 : 16,7 %

bei Gruppe Mn : 16,9 %

Zwischen den mit Mangan vollversorgten und den Manganmangel-Tieren war also kein Unterschied.

B 2.2.3.5. Bestimmung der Mangankonzentration im Versuchsfutter und im Lebergewebe

Die verwendete Methode und die Durchführung der Bestimmung sind bei A 2.2.5.5. beschrieben. Zur Bestimmung der Mangankonzentration im Lebergewebe wurde die nach der Fettbestimmung verbliebene, gefriergetrocknete Leber verwendet.

B 2.3. Versuchsergebnisse

B 2.3.1. Retention von Mangan in der Leber

Tabelle 7: Mangankonzentration in der Leber in Abhängigkeit von der Manganzufuhr

Tiergruppe	Mn-Gehalt der Kost (mg/kg)	Mangankonzentration in der Leber	
		µg Mn/100 g Frischsubstanz	µg Mn/g Asche
0	< 1	24,6 ± 3,0	17,4 ± 2,4
Mn	50	142,6 ± 15,1	98,6 ± 9,4

Die Ergebnisse der Tabelle 7 zeigen einen deutlichen Zusammenhang zwischen der alimentären Manganzufuhr und der Retention von Mangan in der Leber. Die Werte stimmen mit den Ergebnissen bei A 2.3.2.

der Arbeit fast überein. Die Mangankonzentration in der Leber war bei der mit Mangan vollversorgten Tiergruppe beinahe sechsmal so hoch wie bei der Mangel-Gruppe. Die Differenz ist bei $P < 0,1 \%$ signifikant.

B 2.3.2. Aktivität der Tryptophan-Pyrrolase in der Leber bei unterschiedlicher alimentärer Manganzufuhr

Die bei der Bestimmung der Tryptophan-Pyrrolase-Aktivität gewonnenen Ergebnisse werden in Tabelle 8 wiedergegeben:

Tabelle 8: Aktivität der Tryptophan-Pyrrolase in Abhängigkeit von der Manganzufuhr

Tiergruppe	Anzahl der Tiere	<u>ohne Mn^{2+}-Zusatz</u> in vitro		<u>mit Mn^{2+}-Zusatz</u> in vitro		Zunahme der Aktivität in %
		μg Kynurenin pro Ansatz	μg Kynurenin pro 100 mg Protein im Ansatz	μg Kynurenin pro Ansatz	μg Kynurenin pro 100 mg Protein im Ansatz	
0	21	77, 3 $\pm$ 21, 0	266, 8 $\pm$ 73, 7	111, 4 $\pm$ 30, 8	384, 4 $\pm$ 108, 6	44, 1 $\pm$ 8, 0
Mn	21	82, 6 $\pm$ 25, 1	288, 4 $\pm$ 88, 3	111, 5 $\pm$ 31, 5	388, 8 $\pm$ 108, 6	35, 0 $\pm$ 8, 5

Durch die unterschiedliche alimentäre Manganzufuhr wurde keine signifikante Differenz in der Tryptophan-Pyrrolase-Aktivität hervorgerufen. Allerdings sind die Werte bei den mit Mangan vollversorgten Tieren etwas höher als bei den Mangeltieren - unabhängig von der Bezugsbasis. Der Wert für die Kynureninsynthese - berechnet als μg Kynurenin pro Ansatz - liegt bei Gruppe Mn um 7 % höher als bei Gruppe 0. Wählt man den Proteingehalt des Ansatzes als Bezugsbasis, so liegt der Wert bei Gruppe Mn um 8 % höher als der Wert bei Gruppe 0. Es zeigt sich

also - bei steigender Mangankonzentration in der Leber - eine Tendenz zur Zunahme der Tryptophan-Pyrrolase-Aktivität. Zugabe von $3 \mu\text{Mol}$ Mangan in vitro bewirkte bei beiden Versuchsgruppen eine signifikante Steigerung der Kynureninbildung. Während jedoch die vollversorgten Tiere eine Aktivitätserhöhung von nur 35 % aufwiesen, zeigten die Mangeltiere eine Aktivitätserhöhung von 44 %. Diese Differenz ist bei $P < 0,5 \%$ signifikant. Es kommt, durch die Zugabe von Mangan im Überschuß, zu einer völligen Angleichung der Aktivität (s. Tab. 8). Hierdurch wird die Vermutung nahegelegt, daß die - oben erwähnten - leichten Unterschiede in der Tryptophan-Pyrrolase-Aktivität (gemessen ohne Mn^{2+} -Zugabe in vitro) tatsächlich durch die unterschiedliche Mangankonzentration im Lebergewebe hervorgerufen werden.

B 2.3.3. Aktivität der Tryptophan-Pyrrolase als Funktion der Mn^{2+} -Konzentration in vitro

Die Ergebnisse der in vitro-Versuche von Pitot und Cho (45) und von Chytil und Skřivanová (3), die eine starke aktivierende Wirkung des Mangans auf die Tryptophan-Pyrrolase feststellen konnten, spiegelten sich in den eigenen in vivo-Versuchen nicht wieder. Um gegebenenfalls Aufschluß darüber zu erhalten, weshalb alimentär verabreichtes und im Lebergewebe auch retiniertes Mangan (s. Tab. 7) die Aktivität der Tryptophan-Pyrrolase unbeeinflusst ließ, wurde die Aktivität der Tryptophan-Pyrrolase als Funktion der Mangankonzentration in vitro geprüft. Die Ansätze - mit 15 verschiedenen Mangankonzentrationen - wurden wie im obigen Versuch hergestellt und auch die Enzymaktivität wurde wie bei B 2.2.3.2. beschrieben bestimmt. Die Ansätze hatten einen pH-Wert von 7,0.

Wie Abb. 2 zeigt, üben die zugegebenen Mn^{2+} -Ionen etwa ab einer Konzentration von $3,4 \cdot 10^{-6} \text{ M}$ einen aktivierenden Effekt auf die Tryptophan-Pyrrolase aus. Die Aktivität des Enzyms erreichte bei einem Manganzusatz von ca. $2 \mu\text{Mol} / \text{Ansatz}$ ($500 \cdot 10^{-6} \text{ M}$) ihr Maximum.

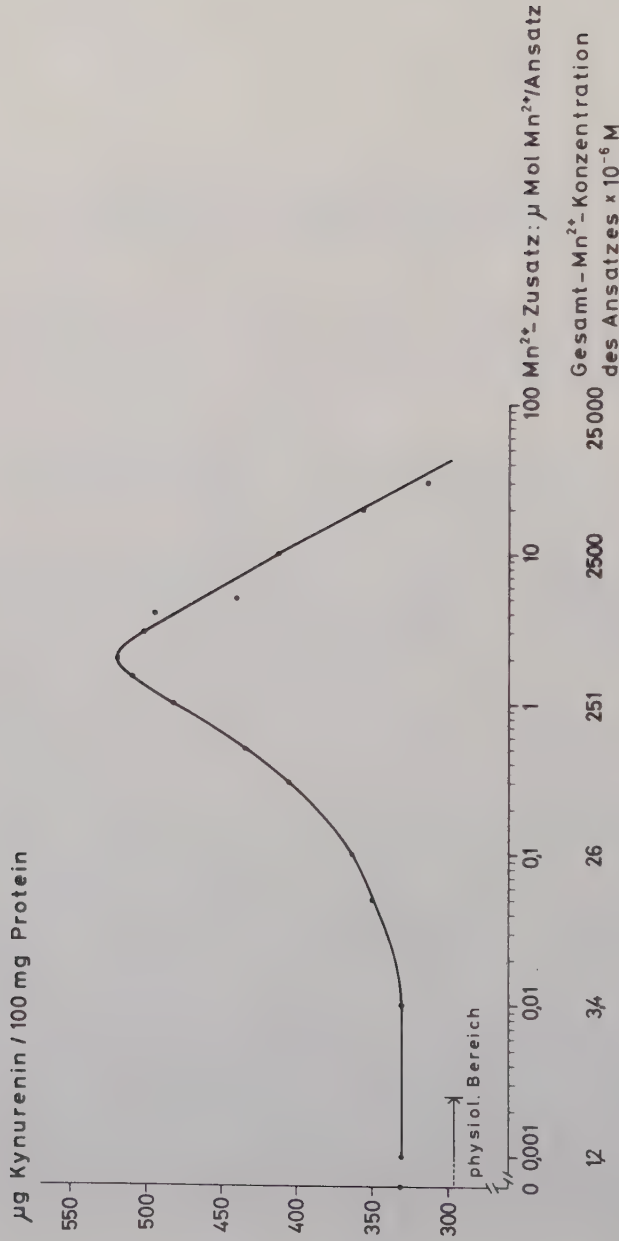


Abb. 2: Aktivität der Tryptophan-Pyrrolase als Funktion der Mn^{2+} -Konzentration im Ansatz

Diese optimale Mangankonzentration stimmt mit dem von Chytil und Skřivanová angegebenen Wert ($3 \mu\text{Mol} / 4 \text{ ml}$ Ansatz) fast überein. - Der relative Aktivitätsanstieg zwischen 0 und $2 \mu\text{Mol Mn}^{2+}$ -Zusatz betrug 58 %.

Interessant im Hinblick auf die in vivo-Versuche ist die Frage, ob schon bei "physiologischen" Mn^{2+} -Konzentrationen, d.h. bei Mn^{2+} -Konzentrationen, wie sie im Lebergewebe gegeben sein können, eine Aktivierung stattfindet. Die Festlegung dieses "physiologischen" Konzentrationsbereiches wurde bereits bei A 2.3.5. besprochen. Der "physiologische" Konzentrationsbereich liegt für die Tryptophan-Pyrrolase etwa zwischen $0,3 \cdot 10^{-6} \text{ M}$ und $1,6 \cdot 10^{-6} \text{ M}$. Diese Mangankonzentrationen sind wesentlich niedriger als die Konzentrationen, wie sie von Pitot und Cho (45), Chytil und Skřivanová (3) und in den eigenen Versuchen zur Aktivierung der Tryptophan-Pyrrolase verwendet wurden. Wie aus Abb. 2 hervorgeht, nimmt der "physiologische" Konzentrationsbereich den äußersten linken Teil der Aktivierungskurve ein. Niedrige Mangankonzentrationen, wie sie dem "physiologischen" Konzentrationsbereich entsprechen, rufen noch keinen Aktivierungseffekt bei der Tryptophan-Pyrrolase hervor.

B 2.4. Diskussion der Ergebnisse

Eine signifikante Abhängigkeit der katalytischen Aktivität der Tryptophan-Pyrrolase in der Leber der Ratte von der alimentären Manganzufuhr konnte in unseren Untersuchungen nicht gefunden werden. Die Tryptophan-Pyrrolase scheint sich in ihrer in vivo-Aktivierbarkeit durch das Mangan wesentlich anders zu verhalten als die Arginase; Die alimentäre Zufuhr der bedarfsdeckenden Mangan-Dosis bewirkte in beiden Versuchen eine etwa gleich starke Anreicherung des Lebergewebes mit Mangan. Während diese Gewebskonzentration an Mangan im Falle der Arginase einen etwa 30 - 40 %igen statistisch sicherbaren Anstieg der Aktivität gegenüber der Manganmangel-Gruppe bewirk-

te, änderte sich die katalytische Wirksamkeit der Tryptophan-Pyrrolase unter vergleichbaren Bedingungen nur minimal. Man könnte das unterschiedliche Verhalten beider Enzyme in vivo - mit dem nötigen Vorbehalt - aus der Kinetik ihrer Aktivierung durch Mn^{2+} -Ionen in vitro erklären. Während sich die Arginase durch Mn^{2+} -Konzentrationen, wie sie im Lebergewebe bei alimentärer Zufuhr des Elementes in physiologischer Dosierung vorliegen ("physiologischer" Konzentrationsbereich), aktivieren läßt, ist dies bei der Tryptophan-Pyrrolase nicht der Fall (vergl. Abb. 1 und Abb. 2). Ein deutlicher Aktivitätsanstieg der Tryptophan-Pyrrolase wird erst erreicht, wenn die Mn^{2+} -Konzentration um ein bis zwei Zehnerpotenzen höher liegt als die obere Grenze des "physiologischen" Bereiches ($1,6 \cdot 10^{-6} M$). Solche Gewebskonzentrationen können selbst bei oraler Zufuhr wesentlich höherer Mangan-Dosen, die den Bedarf um ein mehrfaches überschreiten, nicht erreicht werden (46). Die geringe Differenz (7 %) der Tryptophan-Pyrrolase-Aktivität zwischen den Gruppen 0 und Mn (s. Tab. 8) war statistisch nicht zu sichern. Sie wäre auf alle Fälle zu gering, um ihr eine physiologische Bedeutung beimessen zu können.

Teil C : Glutaminsynthetase (EC 6.3.1.2.) und γ -Glutamyl-
-Transferase (EC 6.3.1.2. ?)

C 1. Literaturübersicht

Ältere Untersuchungen von Speck (56) (57) und von Elliott (7) (8), die unabhängig voneinander durchgeführt wurden, zeigten, daß die Biosynthese des Glutamins nach folgender Reaktionsgleichung verläuft:



Das Enzym, welches die Reaktion katalysiert, ist die Glutaminsynthetase (L-Glutamat-NH₃-Ligase). Anstelle von NH₃ können bei der Reaktion auch Hydrazin oder Hydroxylamin treten, ohne daß sich die Reaktionsrate ändert (8). Bei Zugabe von NH₂OH entsteht Glutamyldydroxamsäure als Reaktionsprodukt, die colorimetrisch bestimmt werden kann (36). Auf diese Weise ist eine Ermittlung der Enzymaktivität möglich. Glutaminsynthetase-Aktivität wurde u. a. in Extrakten aus Taubenleber (56) (57) und aus Schafshirn (7) (8), in Gehirn, Leber und Niere zahlreicher anderer Wirbeltiere (57), in Bakterien (32) (33) und in Erbsensamen (9) gefunden.

Etwas später als die anfangs genannten Veröffentlichungen erschienen die Arbeiten von Grossowicz et al. (21), Stumpf et al. (58) (59) und Schou et al. (54), in denen eine andere enzymatische Reaktion beschrieben wird, die ebenfalls zur Bildung von Glutamyldhydroxamsäure führt:



Im Gegensatz zur Glutaminsynthese, bei der ATP in stöchiometrischen Mengen an der Reaktion teilnimmt (s. Gleichung 1), werden bei dieser Reaktion nur katalytische Mengen an Nukleotid und anorganischem Phosphat benötigt. Da der Mechanismus des Austausches als ein Transfer des Glutamyld-Radikals vom NH₃ zum NH₂OH angesehen werden kann, wurde das katalysierende Enzym als γ -Glutamyl-Transferase be-

zeichnet (21). Anstelle von NH_2OH kann auch NH_3 an der Reaktion teilnehmen, was an Hand von radioaktiv markiertem NH_3 nachgewiesen wurde (6). Transferase-Aktivität konnte in Präparationen aus Bakterien (21), in Extrakten aus Kürbissamen (58) (59) und in verschiedenen Säugetiergeweben nachgewiesen werden.

Hoch gereinigte Präparationen von Glutaminsynthetase katalysieren nicht nur die Glutamin- und γ -Glutamylhydroxamat-Synthese nach Gleichung 1, sondern auch die Reaktion 2. Versuche von Lajtha et al. (32) und von Elliott (9) ergaben, daß das Verhältnis Synthetaseaktivität / Transferaseaktivität während der Enzymisolierung konstant bleibt. In beiden Untersuchungen war es nicht gelungen, die Enzymaktivitäten voneinander zu trennen. Ähnliche Ergebnisse brachte auch die Arbeit von Pamiljans et al. (44). Diese Tatsache hat zu der Annahme geführt, daß sowohl Synthetase- als auch Transferaseaktivität in ein und demselben Enzymmolekül lokalisiert sind und daß die Transferase-Reaktion einen Teil der Synthese-Reaktion - jedoch in umgekehrter Richtung - darstellt (34) (39). Da nicht mit Sicherheit feststeht, daß es sich tatsächlich um ein und dasselbe Enzym handelt, wurde in der vorliegenden Arbeit die E C - Nummer der γ -Glutamyl-Transferase mit einem Fragezeichen versehen⁺.

Sowohl Glutaminsynthetase als auch γ -Glutamyl-Transferase benötigen in vitro metallische Kofaktoren. Speck (Enzympräparat aus Taubenleber) (57) und auch Elliott (Enzympräparat aus Schafshirn) (8) (9) stellten fest, daß gereinigte Glutaminsynthetase-Präparate in Abwesenheit von Mg^{2+} - oder Mn^{2+} -Ionen völlig inaktiv waren. Zugabe von Mg^{2+} -Ionen rief bei pH 7 (57) (8) bzw. 7,5 (9) eine stärkere Aktivierung hervor, als die Zugabe von Mn^{2+} -Ionen - die maximale Aktivierung durch Mn^{2+} war nur halb so groß wie durch Mg^{2+} . Während jedoch die optimale Konzentration der Mg^{2+} -Ionen bei 0,01 M (57), 0,02 M (8) bzw. 0,04 M (9) lag,

+) Obwohl die Möglichkeit besteht, daß es sich bei Glutaminsynthetase und γ -Glutamyl-Transferase um ein und dasselbe Enzym handelt, wird im folgenden einfachheitshalber statt von Glutaminsynthetase-Aktivität und γ -Glutamyl-Transferase-Aktivität von "Glutaminsynthetase" und von " γ -Glutamyl-Transferase" gesprochen.

betrug die optimale Konzentration der Mn^{2+} -Ionen nur 0,002 M (57) bzw. 0,003 M (8). Neuere Arbeiten von Greenberg und Lichtenstein (19), von Monder und Jacobson (41) und von Monder (40) über den Einfluß unterschiedlicher Aktivatorkonzentrationen auf die Glutaminsynthetase-Aktivität in vitro - verwendet wurden jeweils Enzympräparate aus Schafshirn - haben gezeigt, daß bei entsprechendem pH-Wert (4,5 - 5,5) Mn^{2+} -Ionen eine ebenso starke Aktivitätserhöhung hervorrufen können wie Mg^{2+} -Ionen. Dies ist - nach den Ergebnissen der beiden letzteren Autoren - sogar bei einer Mn^{2+} -Konzentration der Fall, die gleich groß ist wie die optimale Mg^{2+} -Konzentration.

Hinweise darauf, daß das Mangan auch als Aktivator der γ -Glutamyl-Transferase eine wichtige Rolle spielt, geben die Arbeiten von Stumpf (58) (59), Schou et al. (54), Elliott (9) und Lajtha et al. (32). Sowohl Stumpf, der mit einem Enzympräparat aus Kürbissamen arbeitete, als auch Schou et al. stellten bei ihren Untersuchungen fest, daß die Anwesenheit von Mn^{2+} -Ionen für den Ablauf der Transferase-Reaktion in vitro unbedingt nötig war. Schou et al. arbeiteten mit Enzympräparaten aus Schafshirn, Schafsleber, Schafsniere und Mäuseleber. Während wässrige Auszüge aus Acetontrockenpulver der genannten Organe ohne Zusatz von Mn^{2+} -Ionen keine Transferase-Aktivität zeigten (pH 5,5), konnte bei Zugabe von 10 μ Mol $MnCl_2$ zu 2 ml Reaktionsmedium Transferase-Aktivität gemessen werden. Zu ähnlichen Ergebnissen kamen auch Elliott (Enzympräparat aus Erbsensamen) und Lajtha et al. (Enzympräparate aus Schafshirn bzw. Taubenleber) bei ihren in vitro-Versuchen, allerdings mit der Einschränkung, daß auch Mg^{2+} -Ionen eine - jedoch viel geringere - aktivierende Wirkung besitzen. Mg^{2+} -Ionen in optimaler Menge riefen in den Untersuchungen von Elliott eine Aktivierung von ca. 60 %, in den Untersuchungen von Lajtha et al. eine Aktivierung von ca. 15 % hervor - bezogen auf eine maximale Aktivität von 100 % bei Mn^{2+} -Zusatz. Im Gegensatz zu Elliott, der eine optimale Mn^{2+} -Konzentration von 0,001 M ermittelte (pH 6,75), fanden Lajtha und Mitarbeiter, daß die γ -Glutamyl-Transferase am stärksten bei einer Mn^{2+} -Konzentration von 0,01 M aktiviert wird

(pH 5,5). Diese Diskrepanz findet eine Erklärung durch die später gewonnenen Ergebnisse von Greenberg und Lichtenstein (19) und von Monder (40), wonach die zur optimalen Aktivierung der Glutamyl-Transferase und der Glutaminsynthetase (jeweils Enzympräparate aus Schafshirn) notwendige Mn^{2+} -Menge je nach dem pH-Wert des Reaktionsmediums verschieden ist. Je niedriger die Konzentration der Mn^{2+} -Ionen, umso weiter verschieben sich die pH-Optima der beiden Reaktionen ins alkalische Milieu und umgekehrt. Während bei der Glutaminsynthetase Mg^{2+} -Ionen und Mn^{2+} -Ionen - bei jeweils optimalem pH-Wert - die gleiche aktivierende Wirkung ausüben (40) (41), zeigt sich bei der Transferase-Reaktion - unabhängig vom pH-Wert - ein stärkerer Effekt des Mangans. In den Untersuchungen von Monder (40) wurde festgestellt, daß bei einer Aktivator-Konzentration von 0,005 M die γ -Glutamyl-Transferase-Aktivität - bei dem jeweils optimalen pH-Wert - bei Zusatz von Mangan um das 1,8 fache höher lag als bei Magnesium-Zugabe. Darüber hinaus ist auch den Aktivierungskurven von Greenberg und Lichtenstein (19) zu entnehmen, daß Mg^{2+} -Ionen auch unter optimalen Bedingungen (Konzentration, pH-Wert) der Glutamyl-Transferase-Reaktion nicht die gleiche Aktivitätserhöhung hervorrufen wie Mn^{2+} -Ionen.

C 2. Eigene Versuche

C 2.1. Problemstellung

Die Frage, ob die Manganversorgung des Organismus die katalytische Aktivität der Glutaminsynthetase und bzw. oder der γ -Glutamyl-Transferase beeinflusst, ist unseres Wissens bisher nicht untersucht worden. Zielsetzung unserer Versuche war es daher zu klären:

1. Ob alimentäre Zufuhr von Mangan in unterschiedlicher Dosierung die Aktivität der Glutaminsynthetase und bzw. oder der γ -Glutamyl-Transferase in der Leber beeinflusst.

2. Wie sich unter unseren Versuchsbedingungen die Aktivität der beiden Enzyme als Funktion der Mangankonzentration in vitro verhält und inwieweit dieses Verhalten zur Erklärung eventueller in vivo Effekte geeignet ist.

C 2.2. Versuchsanordnung, Material und Methoden

C 2.2.1. Versuchstiere, Tierhaltung, Versuchskost und Versuchsanordnung

Als Versuchstiere dienten 40 weibliche Wistar-Ratten⁺, die bei Versuchsbeginn ca. 40 - 50 g schwer waren. - Weiteres siehe unter B 2.2.1. und B 2.2.2. - Am Ende der 170 tägigen Versuchsperiode hatten die Manganmangel-Tiere ein Durchschnittsgewicht von 301 g und die vollversorgten Tiere ein Durchschnittsgewicht von 308 g.

C 2.2.2. Analytische Untersuchungsmethoden

C 2.2.2.1. Vorbereitung des Materials

Am Ende des Versuches wurden die Tiere decapitiert, die Lebern wurden entnommen und nach dem Auskühlen gewogen. Als Ausgangsmaterial für die Bestimmung der Synthetase- und der Transferase-Aktivität diente Acetontrockenpulver, welches folgendermaßen hergestellt wurde: je 2,5 g frische Leber wurden mit 20 ml Aceton von -20⁰ C im Kühlraum bei + 2⁰ C 3 Minuten lang im Messerkreuzhomogenisator zerkleinert. Das gesamte Homogenat von einer Leber wurde im Kühlraum abgenutscht (Schwarzband-Filter⁺⁺) und nochmals mit 150 ml Aceton nachgewaschen. Anschließend wurde das Filter mit dem Homogenat auf einer Petrischale bei + 4⁰ C im Vakuum getrocknet. Das fertige Aceton-

+) Züchter : Mayer - Arendt, Bad Salzuflen

++) Schleicher u. Schüll, Nr. 589¹, Ø 15 cm

trockenpulver wurde bis zur Durchführung der Bestimmungen in einem Exsikkator bei $+ 2^{\circ}\text{C}$ aufbewahrt. - Vorversuche hatten gezeigt, daß noch nach 14 tägiger Aufbewahrung die Enzymaktivität voll erhalten war. - Für die Bestimmung der Enzymaktivität wurde je 1,6 g Aceton-trockenpulver mit der 10fachen Menge K-PO_4 Puffer (0,02 M, pH 7) 3 Minuten lang im Messerkreuzhomogenisator homogenisiert. Das Homogenat wurde 2 Stunden lang bei $+ 2^{\circ}\text{C}$ extrahiert und diente dann für die Ansätze.

C 2.2.2.2. Bestimmung der Glutaminsynthetase- und der γ -Glutamyl-Transferase-Aktivität

Die Bestimmung der Glutaminsynthetase-Aktivität und der γ -Glutamyl-Transferase-Aktivität erfolgte in Anlehnung an die Methoden von Elliott (10) bzw. Lajtha et al. (31) und beruht auf folgendem Prinzip:

a) Glutaminsynthetase: Wie schon in der Literaturübersicht erwähnt wurde, katalysiert die Glutaminsynthetase die Bildung von Glutamin aus Glutaminsäure und NH_3 . Ersetzt man das NH_3 durch Hydroxylamin, so wird statt Glutamin γ -Glutamylhydroxamsäure synthetisiert, deren Konzentration aufgrund ihrer Farbreaktion mit Eisen(III)-chlorid (Lipman u. Tuttle (36)) bestimmt werden kann.

b) γ -Glutamyl-Transferase: das Enzym katalysiert - wie in der Literaturübersicht erwähnt - die Bildung von γ -Glutamylhydroxamsäure aus Glutamin und Hydroxylamin. Die Hydroxamsäure wird wie bei a) colorimetrisch bestimmt. Das Absorptionsmaximum des Eisen-Hydroxamats liegt zwischen 480 und 540 m μ .

Die Arbeitsvorschriften von Elliott und Lajtha et al. beziehen sich auf die Bestimmung der Aktivität von Enzympräparaten. Damit auch im Leberhomogenat gut meßbare Umsatzraten erzielt wurden, mußten die Versuchsbedingungen erheblich abgewandelt werden. Als Maß für die Wirksamkeit der Glutaminsynthetase und der γ -Glutamyl-Transferase diente die Hydroxamsäuremenge, welche jeweils durch 0,7 ml Leber-

homogenat unter konstanten Reaktionsbedingungen - pH 7, Temp. 37°C - während einer Reaktionszeit von 12 Stunden gebildet wurde. Bei der Bestimmung wurden Parallelansätze jeweils mit und ohne Zugabe von Mangan gemacht. Die Höhe des Manganzusatzes betrug bei der Glutaminsynthetase 1 $\mu\text{Mol Mn}^{2+}$ pro Ansatz, da sich diese Mangankonzentration in orientierenden Vorversuchen als am stärksten aktivierend erwies. Den Proben zur Bestimmung der γ -Glutamyl-Transferase-Aktivität wurde 3 $\mu\text{Mol Mn}^{2+}$ zugesetzt.

Reagentien:

Imidazol - HCl - Puffer (0,2 M, pH 7)

0,1 M Lösung von L (+)-Glutamin in aqua bidest

0,2 M Lösung von Na - L-Glutamat in aqua bidest

0,001 M Lösung von Adenosin-5'-diphosphat in aqua bidest

0,05 M Lösung von Adenosin-5'-triphosphat in aqua bidest

0,2 M Lösung von Hydroxylammoniumchlorid (pH 7)

Die Lösung muß täglich frisch hergestellt werden aus einer 4 M Hydroxylamin-Stammlösung: 5 ml der Stammlösung werden mit ca. 60 ml H₂O bidest verdünnt, der pH-Wert wird mit 1 N NaOH auf pH 7 eingestellt und anschließend das Volumen auf 100 ml aufgefüllt.

0,1 M Lösung von MnSO₄ · H₂O in aqua bidest

15 % ige Trichloressigsäure

2,5 N HCl

5 % ige Lösung von FeCl₃ in 0,1 N HCl

γ -Glutamylhydroxamsäure-Standardlösung:

811 mg synthetische Glutamohydroxamsäure⁺ wurden in 1 l aqua dest. gelöst. Diese 5 mM Standardlösung wurde zur Herstellung der Eichkurve verwendet (s. Abb. 7).

+) L-Glutamic- γ -mono-hydroxamate (GHA), kristallin
MG: 162,2 (wasserfrei); Sigma Chemical Company, St. Louis USA

Durchführung der Bestimmung:

Die Proben wurden in folgender Reihenfolge in Zentrifugengläser einpipettiert:

a) Ansatz für die Bestimmung der Glutaminsynthetase-Aktivität

- 0,7 ml Leberhomogenat
- 0,5 ml Imidazolpuffer
- 0,5 ml ATP - Lösung
- 0,5 ml Na-Glutamat-Lösung
- 0,5 ml Hydroxylamin-Lösung

Probe A (ohne Mn^{2+} -Zugabe in vitro) erhielt einen Zusatz von 10 μ l aqua bidest. Probe B (mit Mn^{2+} -Zugabe in vitro) erhielt einen Zusatz von 10 μ l $MnSO_4$ -Lösung. Der Blindwert bestand aus 0,7 ml Homogenat,
0,5 ml Imidazol-
puffer
und 1,51 ml aqua bidest

b) Ansatz für die Bestimmung der γ -Glutamyl-Transferase-Aktivität

- 0,7 ml Leberhomogenat
- 0,5 ml Imidazolpuffer
- 0,1 ml ADP - Lösung
- 0,8 ml Glutamin-Lösung
- 0,2 ml Hydroxylamin-Lösung

Probe A (ohne Mn^{2+} -Zugabe in vitro) erhielt außerdem einen Zusatz von 30 μ l aqua bidest. Probe B (mit Mn^{2+} -Zugabe in vitro) erhielt einen Zusatz von 30 μ l $MnSO_4$ -Lösung. Der Blindwert bestand aus
0,7 ml Homogenat,
0,5 ml Imidazolpuffer
und 1,13 ml aqua bidest

Für Probe A und B wurden jeweils 3 Parallelansätze, für den Blindwert 2 Parallelansätze gemacht. Die Zentrifugengläser wurden mit Stopfen verschlossen und nach kurzem Durchmischen bei 37° C im Wasserbad inkubiert. Nach 12 Stunden wurde die Synthese- bzw. Transferase-

Reaktion durch Zugabe von 0,5 ml TCE-Lösung gestoppt. Anschließend wurde in jede Probe nacheinander 0,5 ml HCl und 0,5 ml FeCl_3 -Lösung einpipettiert. Die Proben wurden gut durchmischt und blieben 5 Minuten stehen, dann wurde der ausgefällte Niederschlag mit Schwarzbändfiltern ($\varnothing$ 7 cm) abfiltriert. Das Filtrat wurde in 1 cm - Cuvetten bei 492 m μ photometriert (Zeiss-Spektralphotometer) und damit die Extinktion des gebildeten Eisen(III)-Hydroxamats bestimmt.

Berechnung der Enzymaktivität: Die gebildete Hydroxamsäuremenge wurde aus der Extinktionsdifferenz zwischen Meßwert und Blindwert an Hand der Eichkurve ermittelt. Die Aktivität der Glutaminsynthetase und der γ -Glutamyl-Transferase wurde in μMol Glutamohydroxamsäure / Ansatz und in μMol Glutamohydroxamsäure / 100 mg Protein im Ansatz angegeben.

C 2.2.2.3. Bestimmung der Proteinkonzentration im Leberhomogenat

Der Proteingehalt des für die Ansätze verwendeten Homogenates wurde nach der Methode von Lowry u.a. ermittelt (Beschreibung der Methode und Durchführung der Bestimmung: s. A 2.2.5.3.). Für den Bestimmungsansatz wurde das Homogenat im Verhältnis 1 : 500 mit aqua dest. verdünnt.

C 2.2.2.4. Bestimmung der Mangankonzentration in der Leber und im Leber-Aceton-trockenpulver

Zur Bestimmung der Mangankonzentration im Lebergewebe wurde die nach der enzymatischen Bestimmung verbliebene Leber gefriergetrocknet und verascht. Es wurde außerdem der Mangangehalt des Aceton-trockenpulvers analysiert. Dabei wurde in der gleichen Weise verfahren wie bei der gefriergetrockneten Leber. Durchführung der Bestimmung: s. A 2.2.5.5.

C 2.3. V Versuchsergebnisse

C 2.3.1. Retention von Mangan in der Leber

Tabelle 9: Mangankonzentration in der Leber in Abhängigkeit von der Manganzufuhr

Tiergruppe	Mn-Gehalt der Kost (mg/kg)	Mangankonzentration in der Leber	
		$\mu\text{g Mn} / 100 \text{ g Frischsubstanz}$	$\mu\text{g Mn} / \text{g Asche}$
0	< 1	$25,5 \pm 4,8$	$18,2 \pm 3,4$
Mn	50	$140,7 \pm 9,2$	$100,5 \pm 6,6$

Auch in diesem Falle zeigte sich ein deutlicher Zusammenhang zwischen alimentärer Manganzufuhr und dem Mangangehalt der Leber. Die Werte stimmen mit den Ergebnissen des vorhergehenden Versuches (Tab. 7) sehr gut überein. Auch diesmal war die Mangankonzentration in der Leber bei der Mangan-vollversorgten Gruppe beinahe sechsmal so hoch wie bei der Mangel-Gruppe. Die Differenz ist bei $P < 0,1 \%$ signifikant.

C 2.3.2. Aktivität der Glutaminsynthetase und der γ -Glutamyl- -Transferase in der Leber bei unterschiedlicher alimentärer Manganzufuhr

Die Ergebnisse der Enzymaktivitäts-Bestimmungen werden in Tabelle 10 und 11 wiedergegeben:

Tabelle 10: Aktivität der Glutaminsynthetase in Abhängigkeit von der Manganzufuhr

Tier- gruppe	Anzahl der Tiere	ohne Mn^{2+} -Zusatz in vitro		mit Mn^{2+} -Zusatz in vitro	
		$\mu\text{Mol GHA}^+$ pro Ansatz	$\mu\text{Mol GHA}$ pro 100mg Protein im Ansatz	$\mu\text{Mol GHA}$ pro Ansatz	$\mu\text{Mol GHA}$ pro 100mg Protein im Ansatz
0	18	$1,27 \pm 0,13$	$3,76 \pm 0,44$	$1,76 \pm 0,23$	$5,21 \pm 0,74$
Mn	18	$1,30 \pm 0,09$	$3,99 \pm 0,32$	$1,77 \pm 0,13$	$5,47 \pm 0,48$

+) γ -Glutamylhydroxamsäure

Wie aus Tabelle 10 hervorgeht, wirkte sich die unterschiedliche alimen-
täre Manganzufuhr auf die Synthetaseaktivität nicht aus. Die Hydroxam-
säuresynthese verlief bei den Manganmangel-Tieren mit gleicher Inten-
sität wie bei den vollversorgten Tieren. Eine leichte Erhöhung der
Enzymaktivität (6 %) bei Gruppe Mn gegenüber Gruppe 0 zeichnet sich
ab, wenn die Aktivität in $\mu\text{Mol GHA}/100 \text{ mg Protein}$ im Ansatz berech-
net wird (ohne Mn^{2+} in vitro). Diese Differenz ist aber nicht signifi-
kant. Die Zugabe von 1 $\mu\text{Mol Mangan}$ in vitro bewirkte bei beiden Grup-
pen eine signifikante Steigerung der Hydroxamsäuresynthese. Sie betrug
bei Gruppe 0 38,6 % und bei Gruppe Mn 36,9 %.

Auch bei der γ -Glutamyltransferase zeigte die Enzymaktivität keine
Korrelation zur Manganversorgung (s. Tabelle 11):

Tabelle 11: Aktivität der γ -Glutamyltransferase in Abhängigkeit von der Manganzufuhr

Tier- gruppe	Anzahl der Tiere	<u>ohne</u> Mn^{2+} -Zusatz in vitro		<u>mit</u> Mn^{2+} -Zusatz in vitro	
		μ Mol GHA ⁺ pro Ansatz	μ Mol GHA pro 100mg Protein im Ansatz	μ Mol GHA pro Ansatz	μ Mol GHA pro 100mg Protein im Ansatz
0	18	1,36 $\pm$ 0,10	4,04 $\pm$ 0,37	7,42 $\pm$ 0,75	22,00 $\pm$ 2,39
Mn	18	1,36 $\pm$ 0,17	4,20 $\pm$ 0,65	7,52 $\pm$ 0,78	23,15 $\pm$ 2,27

+) γ -Glutamylhydroxamsäure

Die Werte der mit Mangan vollversorgten Tiergruppe sind nicht wesentlich höher als die der Mangelgruppe. Der Zusatz von 3 μ Mol Mangan zum Reaktionsmedium bewirkte eine starke Erhöhung der γ -Glutamyl-Transferase-Aktivität auf das 5 1/2 fache des ohne Manganzusatz gemessenen Wertes. Der Aktivitätsanstieg war bei beiden Gruppen gleich groß.

C 2.3.3. Aktivität der Glutaminsynthetase und der γ -Glutamyl-Transferase als Funktion der Mn^{2+} -Konzentration in vitro

Nach Durchführung der oben beschriebenen Versuche wurde - ebenso wie für die Tryptophan-Pyrrolase - die Aktivität der Glutaminsynthetase sowie der γ -Glutamyl-Transferase als Funktion der Mn^{2+} -Konzentration in vitro ermittelt, um eventuell Aufschluß darüber zu erhalten, warum die Versuche in vivo anders ausfielen, als die Ergebnisse von in vitro-Versuchen zahlreicher Autoren hätten erwarten lassen. Die Ansätze enthielten Acetontrockenpulver aus Rattenleberhomogenat (s. C 2.2.2.1.) und entsprachen - mit Ausnahme der Mangan-Zusätze - denen, die unter C 2.2.2.2. beschrieben wurden.

Die Aktivierungskurve der Glutaminsynthetase (s. Abb. 3) zeigt ein erstes Maximum der Enzymaktivität bei etwa einer Mangankonzentration von $483 \cdot 10^{-6} \text{ M}$. (Mn^{2+} -Zusatz: $1,3 \mu\text{Mol/Ansatz}$). Der relative Aktivitätsanstieg zwischen 0 und $1,3 \mu\text{Mol Mn}^{2+}$ -Zusatz betrug ca. 37 %. Bei Erhöhung der Manganzugabe bis hin zu einem Wert von $10 \mu\text{Mol}$ pro Ansatz nahm die Enzymaktivität ab, um dann erneut - über das erste Maximum hinaus - anzusteigen.

Im Gegensatz zur Glutaminsynthetase zeigt die Aktivierungskurve der γ -Glutamyl-Transferase (s. Abb. 4) nur 1 Maximum der Enzymaktivität, das etwa bei einer Mangankonzentration von $10436 \cdot 10^{-6} \text{ M}$ liegt. Bei dieser Mangankonzentration steigt die Transferase-Aktivität auf das fast 7fache ihres Ausgangswertes ohne Mn^{2+} -Zusatz an.

Sowohl für die Glutaminsynthetase als auch für die γ -Glutamyl-Transferase wurde der "physiologische" Konzentrationsbereich des Mangans (Definition s. bei A 2.3.5.) ermittelt:

Glutaminsynthetase: $0,3 \cdot 10^{-6} \text{ M}$ bis $1,9 \cdot 10^{-6} \text{ M}$

γ -Glutamyl-Transferase: $0,4 \cdot 10^{-6} \text{ M}$ bis $2,2 \cdot 10^{-6} \text{ M}$

Diese Mangankonzentrationen sind sehr viel niedriger als die Konzentrationen, wie sie von Speck (57), Elliott (8) (9), Stumpf et al. (59), Schou et al. (54) und Lajtha et al. (32) zur Aktivierung der Glutaminsynthetase und der γ -Glutamyl-Transferase in vitro verwendet wurden (s. C 1.). Wie Abb. 3 und 4 zeigen, nehmen die "physiologischen" Konzentrationsbereiche den äußersten linken Teil der Aktivierungskurven ein. Aus der Aktivierungskurve der γ -Glutamyl-Transferase (Abb. 4) läßt sich ersehen, daß bei diesen geringen Mangankonzentrationen noch keine Aktivierung des Enzyms stattfindet. Ein Anstieg der Aktivität beginnt erst bei einer Mangankonzentration von $23,0 \cdot 10^{-6} \text{ M}$. Dagegen zeigt die Aktivierungskurve der Glutaminsynthetase (Abb. 3) einen leichten Anstieg der Aktivität bereits im Bereich der "physiologischen" Mangankonzentration. Der relative Aktivitätsanstieg zwischen der Mangankonzentration von $1,2 \cdot 10^{-6} \text{ M}$ und von $1,9 \cdot 10^{-6} \text{ M}$ beträgt ca. 3 %.

μ Mol GHA / 100 mg Protein

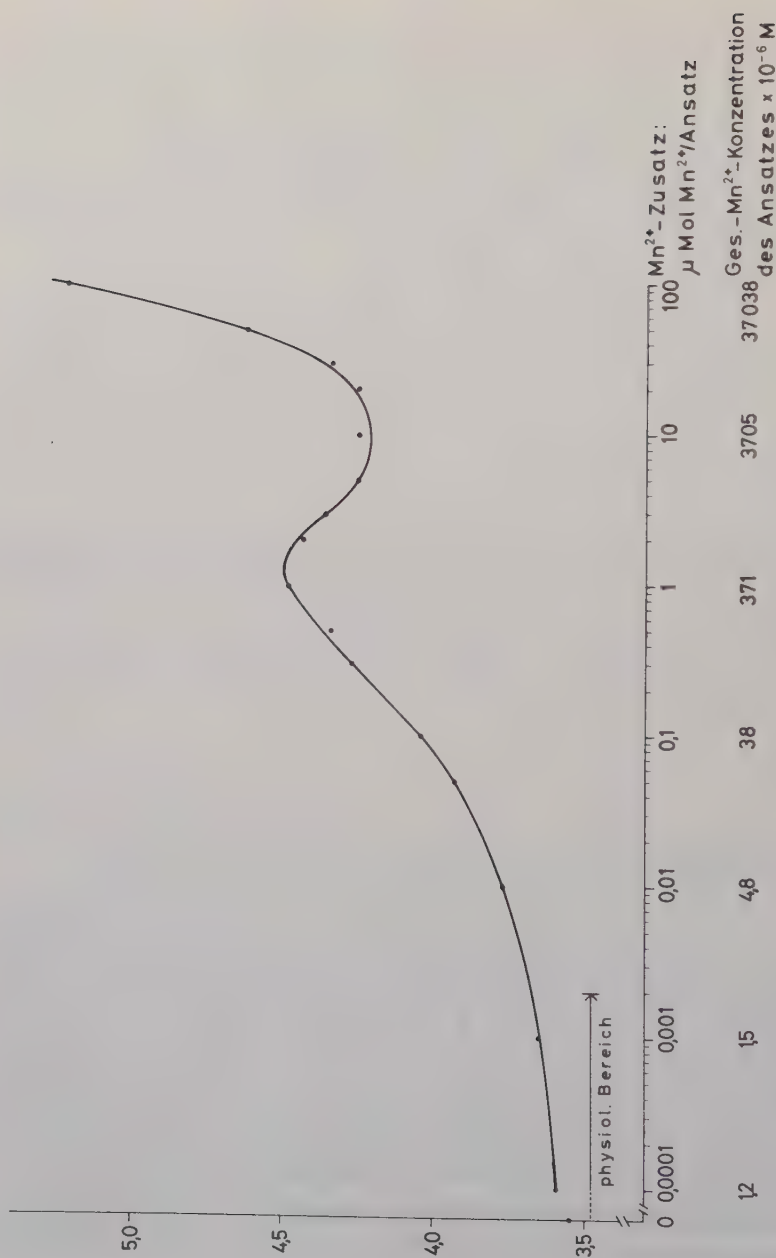


Abb. 3: Aktivität der Glutaminsynthetase als Funktion der Mn^{2+} -Konzentration im Ansatz
(GHA = γ -Glutamylhydroxamsäure)

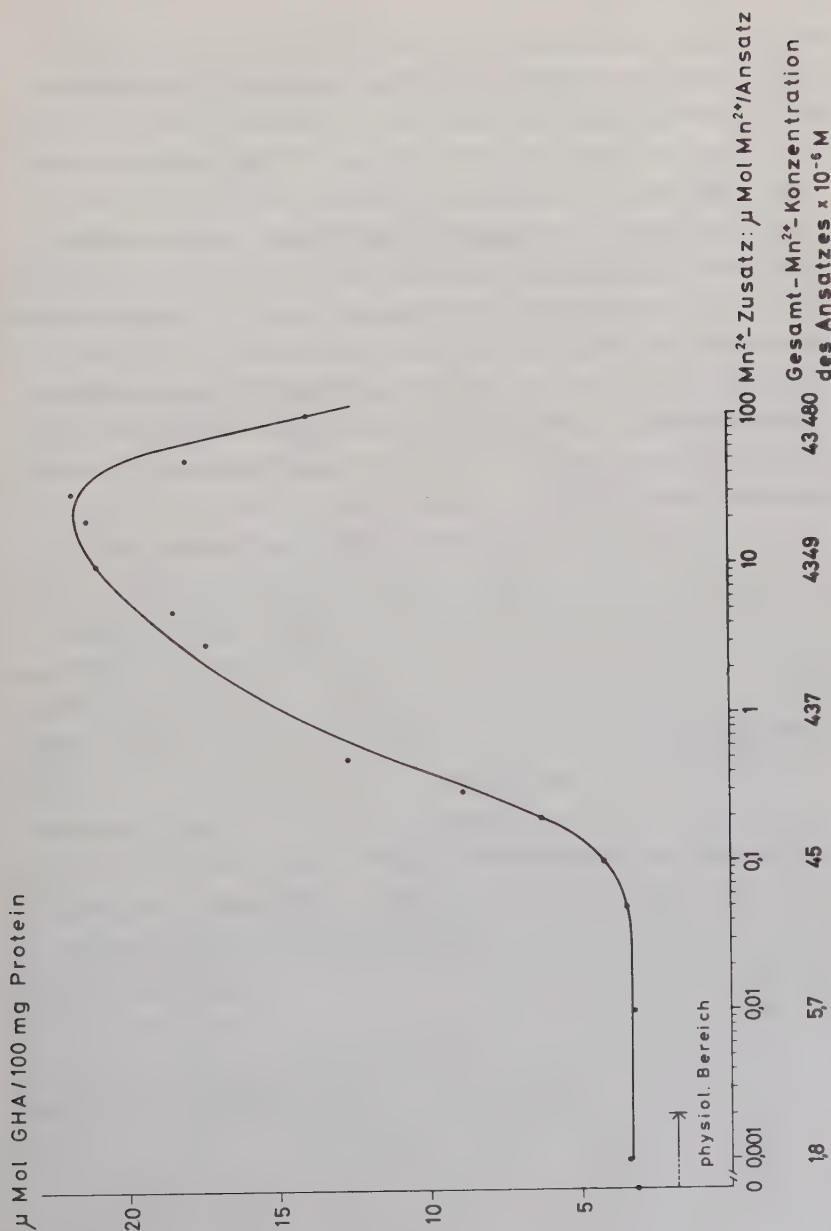


Abb. 4: Aktivität der γ -Glutamyl-Transferase als Funktion der Mn^{2+} -Konzentration im Ansatz
(GHA = γ -Glutamylhydroxamsäure)

C 2.4. Diskussion der Ergebnisse

Die im Teil C untersuchten enzymatischen Reaktionen hatten es mit dem Verhalten der Tryptophan-Pyrrolase gemeinsam, daß sich ihre Rate in vivo durch alimentäre Zufuhr des Effektors nicht - oder zumindest nicht signifikant - beeinflussen ließ, obwohl Mangan auch in diesem Falle im erwarteten Umfang retiniert wurde. Die Glutaminsynthetase-Aktivität in den Lebern der mit Mangan vollversorgten Tiere zeigte zwar einen leichten Anstieg von 6 % gegenüber der Mangelgruppe (s. Tab. 10), diese Differenz war jedoch zu gering um statistisch sicherbar zu sein und sie wäre sicherlich auch ohne physiologische Relevanz. Die kinetischen Untersuchungen über die Aktivierung der Glutaminsynthetase durch Mn^{2+} -Ionen in vitro ergaben eine zweigipflige Aktivierungskurve (s. Abb. 3), was das Vorhandensein zweier Bindungsstellen für Mangan am Enzymprotein vermuten läßt. Der Anstieg zum ersten Gipfel, der bei einer Mangankonzentration von $5 \cdot 10^{-4}$ M liegt, beginnt bereits bei Mangankonzentrationen im "physiologischen" Bereich. Allerdings ist der Anstieg bis zur oberen Grenze des "physiologischen" Bereiches noch so gering, daß dieser Effekt nur mit äußerster Vorsicht zur Erklärung der ebenfalls sehr geringen Differenz, die sich in vivo ergeben hatte, herangezogen werden könnte.

Die Aktivität der γ -Glutamyl-Transferase ließ sich in vivo durch alimentär zugeführtes Mangan überhaupt nicht beeinflussen. Eine Aktivierung dieses Enzyms durch Mn^{2+} -Ionen in vitro konnte erst durch Mangankonzentrationen erreicht werden, die weit oberhalb des "physiologischen" Bereiches lagen.

Allgemeine Diskussion

Die Kinetik der vier in der vorliegenden Arbeit untersuchten enzymatischen Reaktionen ließ sich unter den gewählten Versuchsbedingungen in vitro durch Mangan eindeutig beeinflussen. Bei alimentärer Zufuhr von Mangan ließ sich zwar die Aktivität der Arginase in der Leber der Versuchstiere signifikant erhöhen, nicht jedoch die katalytische Wirksamkeit der übrigen untersuchten Enzyme, obwohl die Retention des Mangans in allen Versuchen gleich war. Die Aktivierungskinetik der Enzyme konnte zur Interpretation des unterschiedlichen in vivo-Verhaltens der Enzyme herangezogen werden: Die Aktivität der Arginase ließ sich bereits durch Mangan-Konzentrationen erheblich steigern, die am natürlichen Wirkungsort des Enzyms normalerweise gegeben sein können. Die übrigen Enzyme ließen sich dagegen auch in vitro erst bei Mangan-Konzentrationen in nennenswertem Maße aktivieren, die weit oberhalb der physiologischen Gewebekonzentration liegen.

Die Höhe der alimentären Manganzufuhr konnte zwar die Aktivität der Leberarginase beträchtlich beeinflussen, die Aktivität dieses Enzyms blieb jedoch ohne Einfluß auf die Menge des Endproduktes des Harnstoffzyklus, dessen Mitglied die Arginase ist. Die Manganversorgung war also ohne Einfluß auf die biosynthetische Kapazität des Organismus für den Harnstoff. Für den Ablauf dieser biochemischen Funktion scheint somit die Manganversorgung des Organismus ebenso belanglos zu sein, wie für die anderen drei biochemischen Reaktionen.

Dennoch möchten wir die in der Spurenstoff-Enzym-Hypothese von Green (18) formulierte Ansicht vertreten, daß die biologische Bedeutung der Spurenelemente - und somit auch des Mangans - durch ihre Rolle als Effektoren der Enzymkatalyse gegeben ist. Unseres Wissens hat jedoch die von Cotzias (5) 1962 über Mangan ausgesprochene Behauptung: "As of the present, no single function can be ascribed to this metal in vivo." auch zur Zeit noch ihre Gültigkeit.

Zusammenfassung

Teil A: Sowohl der Einfluß verschieden hoher Manganzufuhr als auch die Wirkung unterschiedlicher Proteinzufuhr auf die Aktivität der Leberarginase in vivo war Gegenstand der Untersuchungen mehrerer Autoren. Die hinsichtlich ihrer Intensität durchaus vergleichbaren Effekte ließen es interessant erscheinen, die Aktivität der Arginase sowie die Intensität der Biosynthese von Harnstoff bei kombiniertem Einwirken beider Faktoren zu untersuchen. Zielsetzung der durchgeführten Versuche war es festzustellen:

1. Ob und bei welcher quantitativen Relation der beiden Faktoren die durch Manganmangel bedingte Depression der Arginaseaktivität durch die aktivitätssteigernde Wirkung eines hohen Proteinangebotes ausgeglichen werden kann.
2. Ob die durch einen Manganmangel hervorgerufenen Aktivitätsdepression der Arginase sich auf die Harnstoffbildung auswirkt und damit für den Gesamtorganismus eine physiologische Bedeutung erlangt.
3. Wie sich die Aktivität der Arginase als Funktion der Mangankonzentration in vitro verhält und wieweit dieses Verhalten zur Erklärung der Effekte in vivo, bei alimentärer Zufuhr von Mangan, geeignet ist.

Zur Klärung der Fragen 1 und 2 diente ein Tierversuch. Zwei Gruppen zu je 30 weiblichen Ratten erhielten während einer 6-monatigen Vorversuchsperiode eine halbsynthetische Kost mit 20 % Kasein, die bei der einen Gruppe 0,4 mg Mn/kg und bei der anderen Gruppe 50 mg Mn/kg - das ist die zur Bedarfsdeckung der Ratte empfohlene Manganmenge - enthielt. Anschließend wurde sowohl die Manganmangel-Gruppe als auch die mit Mangan vollversorgte Gruppe in 3 weitere Gruppen unterteilt. Gruppe I erhielt 10 % Kasein im Futter, Gruppe II 20 %, Gruppe III 60 %. Die Höhe der Manganzufuhr blieb unverändert. Die Dauer der Hauptversuchsperiode betrug 13 Tage. Während der letzten 3 Versuchstage wurde die Harnstoffausscheidung ermittelt. Die Arginaseaktivität wurde im Leberhomogenat gemessen.

Die Untersuchungen brachten folgende Ergebnisse:

Der durch das hohe Proteinangebot hervorgerufene Aktivitätsanstieg der Arginase (10 % Kasein gegenüber 60 % Kasein) war prozentuell etwa halb so groß wie die Steigerung der Arginaseaktivität durch die hohe Manganzufuhr (1 ppm Mn gegenüber 50 ppm Mn). Die durch den Manganmangel bedingte Depression der Arginaseaktivität konnte durch die aktivitätssteigernde Wirkung eines hohen Proteinangebotes nicht ausgeglichen werden.

Obgleich die Arginaseaktivität bei den Manganmangel-Tieren um 20 - 30 % niedriger lag als bei den mit Mangan vollversorgten Tieren, wurden zwischen Mangel- und vollversorgten Tieren keine Unterschiede in der Harnstoffausscheidung festgestellt. - Die Menge des synthetisierten Harnstoffs war lediglich von der Proteinzufuhr und damit der zum Abbau zur Verfügung stehenden Proteinmenge abhängig.

Bei den in vitro-Untersuchungen über die Abhängigkeit der Arginaseaktivität von der Mn^{2+} -Konzentration war hauptsächlich jener Konzentrationsbereich von Interesse, der mit den im Lebergewebe vorkommenden Mangankonzentrationen größenordnungsmäßig übereinstimmt ("physiologischer" Konzentrationsbereich). Der relative Aktivitätsanstieg der Arginase zwischen der unteren und oberen Grenze des "physiologischen" Konzentrationsbereiches betrug 26 %. In durchaus vergleichbarer Größenordnung - zwischen 32 % und 37 % - bewegte sich der relative Aktivitätsanstieg der Arginase in vivo bei Vergleich der Arginaseaktivität in den Lebern der Manganmangel-Tiere und der mit Mangan vollversorgten Tiere.

Teil B und C: Die aktivierende Wirkung von Mn^{2+} -Ionen sowohl auf die Tryptophan-Pyrrolase als auch auf die Glutaminsynthetase und γ -Glutamyl-Transferase wurde in einer Reihe von Arbeiten beschrieben. Über das in vivo-Verhalten der katalytischen Aktivität dieser Enzyme in Abhängigkeit von der Manganversorgung des Organismus sind keine Untersuchungen bekannt. Zielsetzung unserer Versuche war es, folgende Frage zu klären:

1. Beeinflusst die alimentäre Zufuhr von Mangan in unterschiedlicher Dosierung die Aktivität der Tryptophan-Pyrrolase, Glutaminsynthetase und γ -Glutamyl-Transferase in der Leber?

2. Wie verhält sich unter unseren Versuchsbedingungen die Aktivität der Tryptophan-Pyrrolase, Glutaminsynthetase und γ -Glutamyl-Transferase als Funktion der Mangankonzentration in vitro, und inwieweit ist dieses Verhalten zur Erklärung eventueller in vivo-Effekte geeignet?

Zur Klärung der Frage 1 wurden nacheinander zwei Tierversuche mit 40 bzw. 45 weiblichen Ratten angesetzt. Der erste Versuch sollte über das Verhalten der Tryptophan-Pyrrolase, der zweite über das Verhalten der Glutaminsynthetase und γ -Glutamyl-Transferase Aufschluß geben. Die Tiere waren jeweils in zwei Gruppen - eine Manganmangel- und eine mit Mangan vollversorgte Gruppe - eingeteilt. Sie erhielten das gleiche Futter, das auch bei Teil A während der Vorversuchsperiode verwendet wurde. Am Ende der sechs- bzw. fünf-monatigen Versuchsperiode wurde die Tryptophan-Pyrrolase-Aktivität im Leberzellsaft und die Glutaminsynthetase- und γ -Glutamyl-Transferase-Aktivität im Homogenat aus Leber-Aceton-trockenpulver bestimmt.

Die Untersuchungen brachten folgende Ergebnisse:

Die katalytische Aktivität sowohl der Tryptophan-Pyrrolase, als auch der Glutaminsynthetase und γ -Glutamyl-Transferase zeigte keine signifikante Abhängigkeit von der alimentären Manganzufuhr, obwohl Mangan im gleichen Umfang retiniert wurde, wie bei den Versuchstieren im Teil A. Dieses unterschiedliche Verhalten gegenüber der Arginase ließ sich - mit dem nötigen Vorbehalt - an Hand der Aktivierungskurven erklären: Während die Arginase durch Mn^{2+} -Konzentrationen, wie sie im Lebergewebe bei alimentärer Zufuhr des Elementes in physiologischer Dosierung vorlagen ("physiologischer" Konzentrationsbereich) aktiviert wurde, war dies bei der Tryptophan-Pyrrolase und der γ -Glutamyl-Transferase nicht und bei der Glutaminsynthetase nur in sehr geringem Umfang der Fall. Ein deutlicher Aktivitätsanstieg wurde bei den drei zuletzt genannten Enzymen erst dann erreicht, wenn die Mn^{2+} -Konzentration um ein bis zwei Zehnerpotenzen höher lag als die obere Grenze des "physiologischen" Bereiches.

LITERATURVERZEICHNIS

1. Ashida, K., A.E. Harper: Metabolic adaptations in higher animals
VI. Liver arginase activity during adaptation to high protein
diet. *Proc.Soc.Exptl.Biol.Med.* 107: 151-156 (1961)
2. Boyer, P.D., J.H. Shaw, P.H. Phillips: Studies on manganese
deficiency in the rat. *J.Biol.Chem.* 143: 417-425 (1942)
3. Chytil, F., J. Skřivanová: Manganese as a modifier of the liver
tryptophan pyrrolase activity. *Nature* 193: 377-378 (1962)
4. Chytil, F., J. Skřivanová: Factors influencing the conversion of the
inactive form of liver tryptophan pyrrolase into the active
form. *Coll.Czech.chem.Comm.* 28: 2207-2215 (1963)
5. Cotzias, G.C.: Manganese. in C.L. Comer, F. Bronner: *Mineral
Metabolism*. Vol. 2: 404-433, Academic Press, New York
1962
6. Delwiche, C.C., W.D. Loomis, P.K. Stumpf: Amide metabolism
in higher plants. II. The exchange of isotopic ammonia
by glutamyl transphorase. *Arch.Biochem.Biophys.* 33:
333-338 (1951)
7. Elliott, W.H.: Adenosinetriphosphate in glutamine synthesis.
Nature 161: 128-129 (1948)
8. Elliott, W.H.: Studies on the enzymic synthesis of glutamine.
Biochem.J. 49: 106-112 (1951)
9. Elliott, W.H.: Isolation of glutamine synthetase and glutamo-
transferase from green peas. *J.Biol.Chem.* 201: 661-672
(1953)
10. Elliott, W.H.: Glutamine synthesis.
in: S.P. Colowick, N.O. Kaplan: *Methods of Enzymology*.
Vol. 2: 337-342, Academic Press, New York 1955

11. Fawcett, J.K., J.E. Scott: A rapid and precise method for the determination of urea. *J.clin.Path.* 13: 156-159 (1960)
12. Feigelson, P.: On the role of free radicals in tryptophan pyrrolase catalysis. *Biochim.Biophys.Acta* 92: 187-190 (1964)
13. Feigelson, P.: The cyclic reduction and reoxidation of the hema-
tin coenzyme of tryptophan pyrrolase during catalysis.
Fed.Proc. 23: 163 (1964)
14. Feigelson, P., O. Greengard: A microsomal iron-porphyrin
activator of rat liver tryptophan pyrrolase.
J.Biol.Chem. 236: 153 -157 (1961)
15. Feigelson, P., Y. Ishimura, O. Hayaishi: On the activation and
catalytic mechanism of microbial tryptophan pyrrolase.
Biochem.Biophys.Res.Comm. 14: 96-101 (1964)
16. Folch, J. M. Lees, G.H. Sloane Stanley: A simple method for
the isolation and purification of total lipides from animal
tissues. *J.Biol.Chem.* 226: 497-509 (1957)
17. Folley, S.J., A.L. Greenbaum: Determination of the arginase
activities of homogenates of liver and mammary gland:
Effects of pH and substrate concentration and especially
of activation by divalent metal ions.
Biochem.J. 43: 537-549 (1948)
18. Green, D.E.: Enzymes and trace substances. *Adv.Enzymol* 1:
177-198 (1941)
19. Greenberg, J., N. Lichtenstein: Effect of manganous and magne-
sium ions concentration on glutamine synthetase and glu-
tamotransferase of sheep brain. *J.Biol.Chem.* 234:
2337-2339 (1959)
20. Greengard, O., N. Mendelsohn, G. Acs: Effect of cytoplasmic
particles on tryptophan pyrrolase activity of rat liver.
J.Biol.Chem. 241: 304-308 (1966)

21. Grossowicz, N., E. Wainfan, E. Borek, H. Waelsch: The enzymatic formation of hydroxamic acids from glutamine and asparagine. *J. Biol. Chem.* 187: 111-129 (1950)
22. Hayaishi, O.: L - Kynurenine. *Biochem. Prep.* 3: 108-111 (1953)
23. Hayaishi, O., R.Y. Stanier: The bacterial oxidation of tryptophan. *J. Bact.* 62: 691-709 (1951)
24. Kawachi, T., S. Fuji, T. Suzuki, Y. Yamamura: Isolation and identification of the activator of liver tryptophan pyrrolase. *J. Biochem.* 50: 273-283 (1961)
25. Knox, W.E.: Tryptophan oxidation. in: S.P. Colowick, N.O. Kaplan: *Methods of Enzymology*. Vol. 2: 242-246, Academic Press, New York 1955
26. Knox, W.E., A.H. Mehler: The conversion of tryptophan to kynurenine in liver. *J. Biol. Chem.* 187: 419-430 (1950)
27. Knox, W.E., M. Ogata: Effects of peroxide, catalase, and hematin in the assay of liver tryptophan pyrrolase. *J. Biol. Chem.* 240: 2216-2221 (1965)
28. Knox, W.E., M.M. Piras, K. Tokuyama: Tryptophan pyrrolase of liver. I. Activation and assay in soluble extracts of rat liver. *J. Biol. Chem.* 241: 297-303 (1966)
29. Koßmann, K.T., R. Hintze, K. Lange, F. Menne: Reindarstellung von Arginase aus Rattenleber. *Hoppe-Seylers Z.f. Physiol. Chem.* 346: 163-170 (1966)
30. Krebs, H.A., K. Henseleit: Untersuchungen über die Harnstoffbildung im Tierkörper. *Hoppe-Seylers Z.f. Physiol. Chem.* 210: 33-66 (1932)
31. Lajtha, A.: Glutamine synthetase and transferase. in: Hoppe-Seyler/Thierfelder: *Handbuch der phys.- und path.-chem. Analyse*, Bd. VI/C, 740-744 (1966)

32. Lajtha, A., P. Mela, H. Waelsch: Manganese-dependent glutamotransferase. *J. Biol. Chem.* 205: 553-564 (1953)
33. Leonard, C.G., R.D. Housewright, C.B. Thorne: Effects of metal ions on the optical specificity of glutamine synthetase and glutamyl transferase of *Bacillus licheniformis*. *Biochim. Biophys. Acta* 62: 432-434 (1962)
34. Levintow, L., A. Meister: Reversibility of the enzymatic synthesis of glutamine. *J. Biol. Chem.* 209: 265-280 (1954)
35. Lightbody, H.D., A. Kleinman: Variations produced by food differences in the concentration of arginase in the livers of white rats. *J. Biol. Chem.* 129: 71-78 (1939)
36. Lipman, F., L.C. Tuttle: A specific micromethod for the determination of acyl phosphates. *J. Biol. Chem.* 159: 21-28 (1945)
37. Lowry, O.H., N.J. Rosebrough, A.L. Farr, R.J. Randall: Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193: 265-275 (1951)
38. Mandelstam, J., J. Yudkin: Studies in biochemical adaptation. The effect of variation in dietary protein upon the hepatic arginase of the rat. *Biochem. J.* 51: 681-686 (1952)
39. Meister, A.: Glutamine synthesis. in: P.D. Boyer, H. Lardy, K. Myrbäck: *The Enzymes*. Vol. 6: 443-468, Academic Press, New York 1962
40. Monder, C.: Metal ion interactions and glutamine synthetase activity. *Biochemistry* 4: 2677-2686 (1965)
41. Monder, C., B. Jacobson: Metal ion activators of glutamine synthetase. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 17: 136-140 (1964)
42. Muramatsu, K., K. Ashida: Relation between rat liver xanthine oxidase, arginase activity and urinary nitrogen metabolites. *J. Agr. Chem. Soc. Japan* 31: 607-613 (1957)

43. Nutrient Requirements of Laboratory Animals, National Academy of Sciences - National Research Council, Publ. 990 (1962)
44. Pamiljans, V., P.R. Krishnaswamy, G.D. Dumville, A. Meister: Studies on the mechanism of glutamine synthesis. Isolation and properties of the enzyme from sheep brain. *Biochemistry* 1: 153 (1962)
45. Pitot, H.C., Y.S. Cho: An energy-dependent activation of tryptophan pyrrolase. *Biochim. Biophys. Acta* 50: 197-199 (1961)
46. Rehner, G.: unveröffentlichte Ergebnisse
47. Rehner, G., H.D. Cremer: Zur Ermittlung des Spurenelementbedarfs durch Bestimmung der Enzymaktivitäten. *Die Nahrung* 14/3: 193-201 (1970)
48. Rehner, G., W. Stelte: Einfluß von Mangan, Kobalt und Nickel auf die Aktivität der Leberarginase in vitro und vivo. *Medizin und Ernährung* 11/2: 32-35 (1970)
49. Roholt Jr., O.A., D.M. Greenberg; Liver arginase. IV. Effect of pH on kinetics of manganese-activated enzyme. *Arch. Biochem. Biophys.* 62: 454-470 (1956)
50. Rosenberg, H., A.H. Ennor, J.F. Morrison: The estimation of arginine. *Biochem. J.* 63: 153-159 (1956)
51. Seifter, S., D.M. Harkness, L. Rubin, E. Muntwyler: The nicotinic acid, riboflavin, D-amino acid oxidase and arginase levels of the livers of rats on a protein-free diet. *J. Biol. Chem.* 176: 1371-1381 (1948)
52. Schimke, R.T.: Adaptive characteristics of urea cycle enzymes in the rat. *J. Biol. Chem.* 237: 459-468 (1962)
53. Schimke, R.T.: The importance of both synthesis and degradation in the control of arginase levels in the rat liver. *J. Biol. Chem.* 239: 3808-3817 (1964)

54. Schou, M., N. Grossowicz, A. Lajtha, H. Waelsch: Enzymatic formation of glutamohydroxamic acid from glutamine in mammalian tissue. *Nature* 167: 818-819 (1951)
55. Shils, M.E., E.V. McCollum: Further studies on the symptoms of manganese deficiency in the rat and mouse. *J.Nutr.* 26: 1-19 (1943)
56. Speck, J.F.: The enzymic synthesis of glutamine. *J.Biol.Chem.* 168: 403-404 (1947)
57. Speck, J.F.: The enzymatic synthesis of glutamine, a reaction utilizing adenosine triphosphate. *J.Biol.Chem.* 179: 1405-1426 (1949)
58. Stumpf, P.K., W.D. Loomis: Observations on a plant amide enzyme system requiring manganese and phosphate. *Arch.Biochem.Biophys.* 25: 451-453 (1950)
59. Stumpf, P.K., W.D. Loomis, C. Michelson: Amide metabolism in higher plants. I. Preparation and properties of a glutamyl transphorase from pumpkin seedling. *Arch.Biochem.Biophys.* 30: 126-137 (1951)
60. Tanaka, T., W.E. Knox: The nature and mechanism of the tryptophan pyrrolase (peroxidase-oxidase) reaction of *Pseudomonas* and of rat liver. *J.Biol.Chem.* 234: 1162-1170 (1959)
61. Underwood, E.J.: Trace Elements in Human and Animal Nutrition. 187-214, Academic Press, New York 1962
62. Weber, E.: Grundriß der biologischen Statistik, Gustav Fischer Verlag, Jena 1956
63. Weber, F., O. Wiss: Tryptophan-Pyrrolase. in: Hoppe-Seyler/Thierfelder: Handbuch der phys.- und path.-chem. Analyse, Bd. VI/B, 823-834 (1966)

Herrn Prof. Dr. H.-D. Cremer danke ich herzlich für die mir an seinem Institut gebotene Arbeitsmöglichkeit.

Frau Dr. G. Rehner gilt mein besonderer Dank für die Überlassung des Themas, ihre nie ermüdende Hilfsbereitschaft und ihre wertvollen Hinweise bei der Durchführung und Abfassung dieser Arbeit.

Ebenfalls möchte ich mich bei Herrn Dipl. Chem. W. Stelte bedanken für seine Unterstützung bei der Durchführung der Mangan-Analysen.

LEBENS LAUF

- 21.6.1945 geboren' in Nordenham
- 1951-1955 Besuch der Volksschule in Nordenham
- 1955-1964 Besuch des mathematisch-naturwissenschaftlichen
Zweiges des Gymnasiums in Nordenham
- 13.2.1964 Reifeprüfung
- April 1964 landwirtschaftliches Praktikum auf dem Betrieb
bis Septem- Meyer zu Hörste, Erpen (Kr. Osnabrück)
ber 1964
- Nov. 1964 Praktikum in der bakteriologischen Abteilung
bis April des Instituts für Meeresforschung,
1965 Bremerhaven
- 1965-1969 Studium der Haushalts- und Ernährungswissen-
schaften in Gießen, Fachrichtung: Ernährungs-
wissenschaften
- seit 1.5. Doktorandin am Institut für Ernährungs-
1969 wissenschaft I in Gießen

